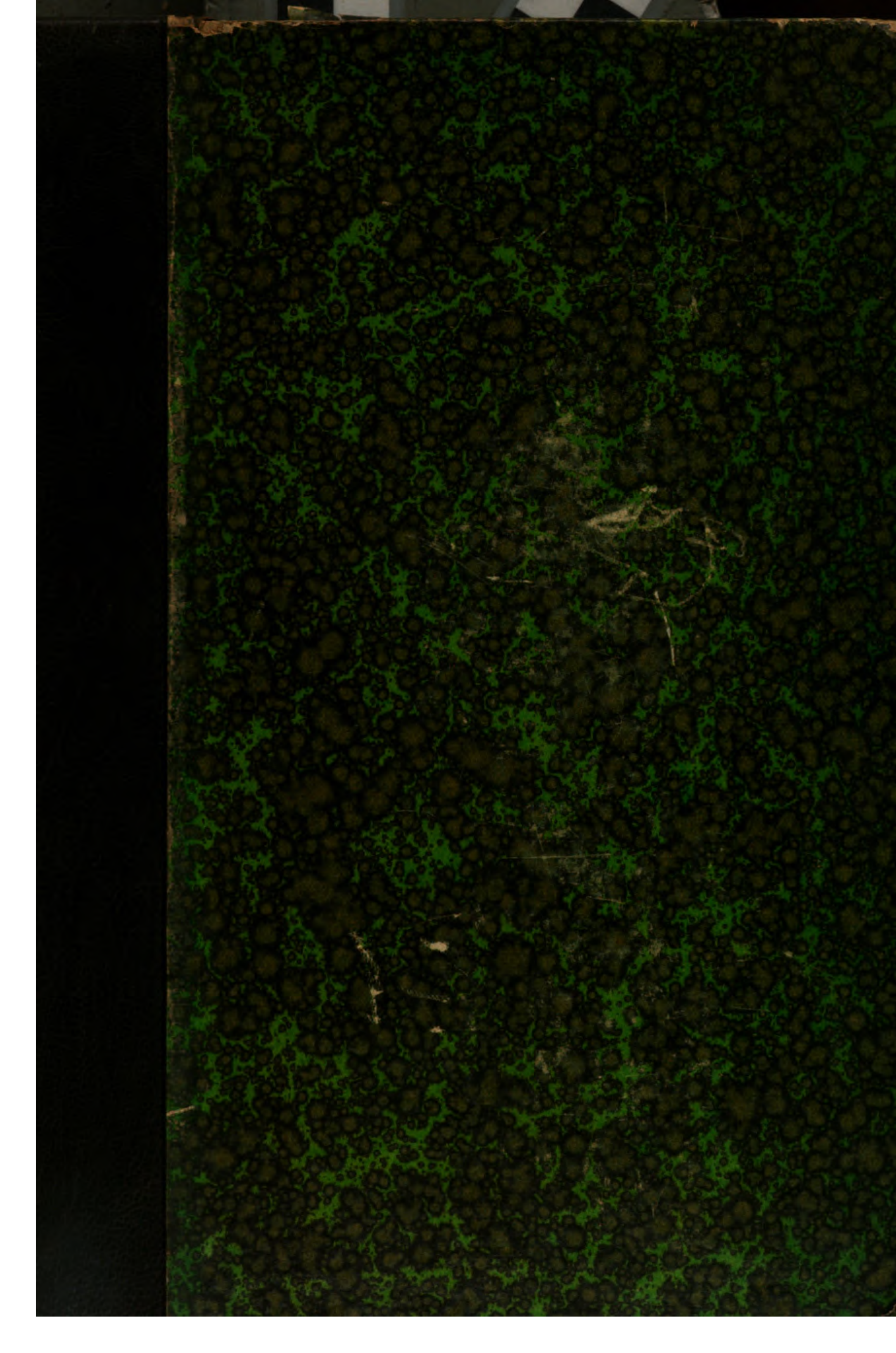






CENTRALBLATT

für

Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten

In Verbindung mit

Prof. Dr. R. Abel, Geh. Obermed.-Rat in Jena
Prof. Dr. M. Braun, Geh. Reg.-Rat in Königsberg
Prof. Dr. R. Pfeiffer, Geh. Med.-Rat in Breslau

herausgegeben von

Prof. Dr. O. Uhlworm, Geh. Reg.-Rat in Bamberg
Präsident Dr. A. Weber in Dresden

und

Prof. Dr. E. Gildemeister, Ober-Reg.-Rat, Berlin-Lichterfelde-W.

Erste Abteilung. 96. Band

Medizinisch-hygienische Bakteriologie und tierische Parasitenkunde

Originale

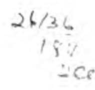
Mit 24 Abbildungen im Text und 19 Tafeln



Jena
Verlag von Gustav Fischer
1925

Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Originale. Bd. 96. Heft 1.

Ausgegeben am 15. August 1925.



Bakteriophagenwirkungen in der Paratyphusgruppe.

[Aus dem Hygienischen Institute der Deutschen Universität Prag Vorstand: Professor Oskar Bail).]

Von **F. Breinl** und **F. Hoder.**

Die Tatsache, daß Bakteriophagen aus Bakterienkulturen entstehen, darf heute wohl als feststehend betrachtet werden. Sie legt den Gedanken nahe, daß die Mutationsvorgänge, die in alten Bouillonkulturen in Erscheinung treten, unter Umständen als Bakteriephagenwirkung gedeutet werden können.

In einer früheren Untersuchung haben Breinl und Fischer[1]) gezeigt, daß aus einem Stamm von Paratyphus B und Fleischvergifter Meißelbeck durch Mutation nach der Methode Baerthlein zahlreiche Varianten hervorgehen, die voneinander morphologisch und serologisch abweichen. Aus beiden Stämmen wurde eine Mutante gezüchtet, die nur mehr den beiden gemeinsamen Rezeptor besaß. Es war also weder durch kulturelle noch durch serologische Methoden möglich, festzustellen, von welchen der beiden Ausgangsstämme die Variante herstammte. Wir versuchten nun, aus denselben Stammkulturen Varianten von gleicher Beschaffenheit durch Einwirkung eines Bakteriophagen zu gewinnen und konnten gleich beim 1. Versuch ein positives Ergebnis verzeichnen. Die Ausbeute an Varianten durch Bakteriophagenwirkung ist mindestens ebenso reich als durch Dauerkultur im flüssigen Medium. Eine kulturelle und serologische Untersuchung des ganzen Materials war bisher nicht möglich, wir beschränken uns daher im folgenden auf die Mitteilung einiger weniger Befunde:

Verwendet wurde der Bakteriophage B_5, der von einem von uns an anderer Stelle beschrieben und mit einer Reihe anderer Paratyphusbakteriophagen identifiziert wurde[2]). Die Bakteriophagen wurden zur Gruppe B zusammengefaßt. Seine Wirkungsbreite erstreckte sich in den damaligen Untersuchungen auf Paratyphus B und Bacillus enteritidis Gärtner. In den vorliegenden Versuchen erwies er sich außerdem als stark wirksam gegen Paratyphus β und schwach wirksam gegen Fleischvergifter Meißelbeck. Die Wirksamkeit gegen Meißelbeck konnte im Laufe einiger Passagen etwas gesteigert werden, blieb aber dauernd, ebenso wie die Vermehrung, weit hinter den Paratyphen zurück.

Die Varianten wurden auf zweierlei Weise gewonnen. Erstens durch direkten Ausstrich der empfindlichen Keime mit Bakteriophagen und zweitens durch gleichzeitige Beimpfung von frischer Bouillon mit Bazillen und Bakteriophagen.

Streicht man Bakteriophagen in genügend starker Konzentration mit sensiblen Bakterien auf Agar aus, so entsteht ein leerer Fleck,

1) Ztschr. f. Immunitätsforsch. Bd. 35. 1923.
2) Hoder, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 93. 1924.

respektive bleibt die ganze bestrichene Fläche steril. In der Regel entwickeln sich aber nach einiger Zeit einzelne Kolonien, die als eine Entwicklung resistenter Keime aufgefaßt werden müssen. Beimpft man Bouillon mit empfindlichen Keimen und Bakteriophagen, so setzt die Trübung weit später ein und bleibt meist dauernd unter der Norm zurück. Aus der getrübten Bouillon kann man dann ebenfalls resistente Keime züchten. Wir bedienten uns bei unseren Versuchen, wie bereits erwähnt, beider Methoden. Vorweggenommen sei an dieser Stelle, daß die Methode des direkten Ausstriches auf Agar eine weit größere Ausbeute an veränderten Keimen liefert als die Bouillonmethode.

Streicht man eine Oese des konzentrierten Bakteriophagen B_5 mit einer Oese einer frischen B-Brühe aus, so gehen nur wenige zerfressene Kolonien (Flatterformen nach Gildemeister) auf, der übrige Teil des bestrichenen Feldes erscheint nach 24 Std. leer. Bei genauer Lupenbetrachtung zeigt sich jedoch, daß das beimpfte Gebiet tatsächlich nicht leer ist, sondern daß zahlreiche kleine und kleinste Kolonien vorhanden sind, die bei längerer Bebrütung heranwachsen. Diese durch die Bakteriophagenwirkung gehemmten Formen unterscheiden sich durch Größe, Transparenz, Oberflächen- und Randbeschaffenheit sehr deutlich voneinander. Schon nach der 1. Passage stellt sich in der Regel ein Wachstum von normaler Ueppigkeit ein, wobei häufig noch ein Aufspalten in mehrere Kolonietypen beobachtet wird. Diese erhaltenen Typen werden dann bis zu endgültiger Konstanz auf Agar weitergeführt.

Aus dem Paratyphus B-Stamm wurden in der geschilderten Weise folgende Formen gewonnen:

Ausgangsform: B. orig. transparent, mit Schleimwall: Ic trübe Kolonien mit auslaufendem Rande, ohne Schleimwall. — 3c Zwergkolonien, transparent, ohne Schleim. — 2a derb, mäßig trüb, ohne Schleimwall. — 3s vollständig verschleimt, fadenziehend, gelblich.

Alle gewonnenen Formen verhalten sich auf Milchzucker-Mannit-Traubenzucker wie der Ausgangsstamm, nur ist die durch 3c hervorgerufene Vergärung infolge der geringeren Vermehrung etwas schwächer. Nach mehreren Agarpassagen erwiesen sich die Varianten als bakteriophagenfrei. Das heißt: Sie trübten die Bouillon in normaler Weise ohne Verzögerung. Wurden die bewachsenen Bouillonen abzentrifugiert, auf 58° erhitzt und mit normalem Paratyphus B ausgestrichen, so entwickelte sich ein normaler Rasen ohne jede Bakteriophagenwirkung.

Es hätte nun erwartet werden müssen, daß die 4 Stämme, die an Stelle eines von einem starken Bakteriophagen vernichteten Rasens als einzelne Kolonien aufgegangen waren, sich als resistent gegenüber B_5 erweisen würden. Der Festigungsversuch zeigte aber, daß die Varianten ihre Empfindlichkeit gegen den Bakteriophagen unverändert beibehalten hatten. Die Beeinflussung äußerte sich lediglich in ihrem veränderten

Tabelle I.

	100	200	500	1000	2000	Kontr.	
B orig.	+++	+++	++±	++	++	—	grob und fein
1c	++	+	±	±	±	±	
3c	+++	+++	++	+	±	—	fein
2a	+++	+++	++	++	+±	—	g. u. f.
3s	+	±	—	—	—	—	f.

kulturellen Verhalten. Neben der kulturellen ergab sich aber auch eine wesentliche serologische Verschiedenheit untereinander und gegenüber dem Ausgangsstamm.

Der ein wenig spontan agglutinable Stamm I c agglutiniert ebenso wie der ganz verschleierte 3s nur in den stärksten Serumkonzentrationen. Die Variante 2a ist von dem erzeugenden Stamm serologisch nicht zu unterscheiden. Die Variante 3c reagiert sehr stark, aber ausschließlich in feinen Flocken.

Wird das benutzte B-Serum mit 3c erschöpft, so behält es nur noch seine grobflockenden Agglutinine. Die Variante 3c, als Antigen verwendet, erzeugt ein Serum, in dem sie selbst, ebenso wie der Ausgangsstamm, nur in feinen Flocken agglutiniert wird. Sie unterscheidet sich also von ihm durch das Fehlen des thermolabilen Rezeptorenapparates und ist daher als Verlustmutante anzusprechen. Sie verhält sich morphologisch und antigen genau so wie die von Breinl und Fischer seinerzeit als O-Form des Paratyphus bezeichnete Variante VIIc.

Der verschleimte Stamm 3s, der im Ausgangsserum nur schwach, in feinen Flocken reagiert, zeigt eine auffallende Veränderung seiner Antigenstruktur. Erschöpft man dieses Serum mit 3s, so agglutiniert der erzeugende Stamm darin nur noch rein grobflockend. In einem mit 3s hergestellten Immunserum sind dagegen für den Ausgangsstamm beide Agglutinintypen enthalten, während 3s selbst darin nur in feinen Flocken ausfällt. Nach diesem Befunde ist also der thermostabile Rezeptor des Keimes intakt geblieben, der thermolabile hat dagegen sein Bindungsvermögen, offenbar infolge der Verschleimung, verloren. Demnach ist die Bakteriophagenwirkung in diesem Falle nicht so tiefgreifend gewesen, daß das dem grobflockenden Agglutinin homologe Antigen vollständig vernichtet worden wäre, wie bei der Variante 3c, denn 3s bildet, wie erwähnt, beide Agglutinintypen. Der Stamm 3s wäre demnach als ein Vorstadium von 3c aufzufassen, und in der Tat ist die Zwergform 3c aus einer ganz verschleimten Kolonie bei der Agarpassage abgespalten worden.

Tabelle II.
3 ccm B orig. 1:100 erschöpft mit 1 Kolleschale 3 s.

ersch.	agglut.	100	200	500	1000	2000	Kontr.	
θ	B or.	+++	+++	++±	++	++	—	g. u. f.
θ	3 s	+	±	—	—	—	—	f.
3 s	B or.	+	+	+	+	+	—	grob
3 s	3 s	—	—	—	—	—	—	

Derartige verschleimte Varianten, die nur mehr das feinflockende Agglutinin binden, als Antigen verwendet, aber beide Agglutinintypen erzeugen, wurden in der eingangs erwähnten Untersuchung auch aus alten Bouillonen gezüchtet und ausführlich beschrieben.

Die Variante Ic ist in geringem Grade spontanflockend und agglutiniert im Serum des Ausgangsstammes nur in der Verdünnung $^1/_{100}$ und $^1/_{200}$ deutlich stärker als in der Kontrolle. Wird das Paratyphus B-Serum mit Ic energisch vorbehandelt, so verliert es nur einen Teil seiner Agglutinine, eine vollständige Erschöpfung gelingt nicht. Zwischen beiden Keimen besteht also eine nur teilweise Rezeptorengemeinschaft. Der Unterschied zwischen dem Ausgangsstamm und der

Variante Ic wird sofort klar, wenn man das von Ic erzeugte Serum untersucht.

Tabelle III.
Serum 1 c.

agglut.	100	200	500	1000	2000	Kontr.	
1 c	+++	+++	+++	+++	++	±	grob und fein
B or.	+±	+	+	±	±	—	f.

Man entnimmt der Tabelle, daß der Stamm Ic, dessen Bindungsvermögen für die Agglutinine des Ausgangsserums stark herabgesetzt ist, für den orig. Paratyphus B nur das feinflockende Agglutinin bildet, während er selbst im Eigenserum in groben und feinen Flocken ausfällt. Der Stamm Ic muß demnach als Additionsmutante bezeichnet werden, denn er hat einen Rezeptor erworben, der dem Ausgangsstamme fehlt.

Der Stamm Meißelbeck wurde in gleicher Weise untersucht. Eine Oese einer frischen Brühekultur wird, mit einer Oese Bakteriophagen gemischt, auf der Agarplatte ausgestrichen und die verschiedenen Kolonien, die an Stelle eines Rasens aufgehen, werden isoliert abgeimpft. Es ergaben sich folgende Formen:

Ausgangsform: M orig transparent, leicht gekörnt. M d etwas kleinere Kolonien, stärker granuliert, trüb. M g vollkommen verschleimt, fadenziehend, gelb. M i Zwergform, transparent, ständig zur Ausgangsform zurückschlagend.

Auf den Zuckernährböden (Milchzucker, Mannit, Maltose) reagieren alle genannten Varianten normal. Ebenso wie die vom Paratyphus B abstammenden behalten sie ihre morphologischen Kennzeichen bei Passagen auf Agar, während sie nach längerem Aufenthalte in flüssigem Medium zu Rückschlägen zur Ausgangsform neigen. In einem mit M orig. erzeugten Serum reagieren die Stämme folgendermaßen:

Tabelle IV.
Serum M original.

Agglut.	100	200	500	1000	2000	Kontr.	
M orig.	+++	+++	+++	++	+	—	grob und fein
M d.	+++	++	++	+	—	—	fein
M g.	—	—	—	—	—	—	
M i.	+++	+++	+++	++	+	—	g. u. f.

M orig. ebenso wie der ständig rückschlagende Stamm Mi fallen in groben und feinen Flocken aus. Md agglutiniert rein feinflockend, bei Mg bleibt jede Reaktion aus.

Die serologische Beziehung zwischen dem original Meißelbeck und dem original Paratyphus B wurde eigens untersucht und ebenso gefunden wie in der erwähnten früheren Arbeit: „Jeder der beiden Stämme wird vom Serum des anderen in groben und feinen Flocken agglutiniert und ist doch nicht imstande, dieses Serum vollständig wie das Eigenserum zu erschöpfen. Entfernt wird aus dem fremden Serum nur das feinflockende Agglutinin und eine Komponente des grobflockenden, während ein mehr oder weniger erheblicher Rest des letzteren immer zurückgelassen wird. Daraus ist zu schließen, daß

der thermostabile und ein thermolabiler Rezeptor beiden Stämmen gemeinsam sind, während jeder der Stämme außerdem noch einen 2. labilen Rezeptor besitzt, an dem seine spezifische Gruppenzugehörigkeit (Paratyphus B oder Fleischvergifter Meißelbeck) kenntlich ist." Von der Wiedergabe der zugehörigen Protokolle kann abgesehen werden.

Der Stamm Md entfernt im Bindungsversuch aus dem orig. M-Serum nur die feinflockenden Agglutinine und erzeugt, einem Kaninchen injiziert, ausschließlich ebensolche Antikörper für sich selbst und den Ausgangsstamm. Md ist also in antigener Hinsicht der B-Variante 3c vollständig gleich und auch der Variante, die wir früher als Mei alt beschrieben haben.

Der Stamm Mg wird infolge seiner starken Verschleimung vom Serum gar nicht beeinflußt und vermag es auch nur ganz mangelhaft zu erschöpfen. Als Antigen verwendet, erzeugt er ein Serum, das beide Agglutinine enthält. Er stellt also ein Analogon zu der Paratyphus-Variante 3s dar.

Es war nun von Interesse, die erhaltenen Varianten der 3 untersuchten Stämme auf ihre Bakteriophagenempfindlichkeit zu prüfen. Verwendung fand eine größere Reihe von Bakteriophagen. Der Kürze halber sollen aber lediglich die vom Normalbefund abweichenden Ergebnisse in Tabellenform wiedergegeben werden:

Tabelle V.

	Ym	Fl_1 k.	B_5
B. orig.	—	±	+++
3ck	—	+++	—
1c	±	+++	+++
3s	—	—	—

B. orig. ist hoch empfindlich gegen den Bakteriophagen B_5 und nur sehr schwach gegen den Coli-Bakteriophagen Fl_1k, der in stärkster Konzentration nur vereinzelte Löcher, meist in den Randpartien des Rasens, hervorruft. 3ck erweist sich als resistent gegen B_5, ist aber hochempfindlich gegen Fl_1k geworden. Ic ist normal empfindlich gegen B_5, aber gleichzeitig hochempfindlich gegen Fl_1k, der keine Rasenbildung mehr zuläßt. Daneben tritt eine leichte Sensibilität gegenüber dem Dysenterie-Bakteriophagen ym auf, die sich im Auftreten weniger Löcher, vorwiegend am Rande des Rasens, äußert, in ähnlicher Weise, wie die Wirkung von Fl_1k gegen B. orig. 3s ist fest gegenüber allen Bakteriophagen. Wie schon eingangs erwähnt, zeichnet sich die Variante 3s durch eine starke Verschleimung aus. Nun ist von Coli-Stämmen her bekannt, daß Schleimbildung als Folge von Bakteriophagenwirkung auftreten kann und eine spezifische scheinbare Festigkeit vortäuscht. Der Schleim wirkt als Kolloid hemmend auf die Bakteriophagenwirkung (Nakamura, Doerr, Brutsaeil, so daß es auf Agar zu einer Lochbildung überhaupt nicht kommt. Das war auch hier der Fall. Ein Vermehrungsversuch brachte Klarheit. Es zeigte sich, daß 3s in Bouillon B_5 reichlich zur Vermehrung bringt, wenn auch ein quantitativer Unterschied gegenüber der Vermehrung mit dem Ausgangsstamm vorhanden ist.

Auffallend war das Verhalten von 3c. Dieser Stamm, eine Mikroform, die in sehr kleinen Kolonien wuchs, spaltet auf der Agarplatte

nicht selten üppig wachsende Kolonien ab, die sich serologisch wie der Ausgangsstamm verhalten, jedoch ohne Schleimwall wachsen. Diese Rückschläge stimmen auch in der Bakteriophagenempfindlichkeit mit dem Ausgangsstamm vollständig überein. Dagegen ist die Mikroform 3c bakteriophagenfest. Ihre Festigkeit läßt sich nur prüfen, wenn man eine Agar-Abschwemmung mit B_5 ausstreicht. Impft man die Variante in Bouillon, so bilden sich sofort die beschriebenen Rückschläge, und die Festigkeit geht verloren. 3c zeigt neben der Resistenz gegen B_5 gleichzeitig eine hohe Empfindlichkeit gegen Fl_1k, stimmt also in letzterem Befunde mit der Variante Ic überein. Zum Verständnis der oben angeführten Tabelle muß also erwähnt werden, daß eine Schräg-agarabschwemmung des lediglich auf Agar relativ stabilen Stammes 3ck auf ihre Empfindlichkeit geprüft wurde, während von den übrigen Stämmen, die Bouillonpassagen vertragen, frische Brühekulturen verwendet wurden.

Einen stabilen resistenten Keim durch die Methode des direkten Ausstriches zu gewinnen, gelang uns nicht. Die Ursache mag in der willkürlichen Abimpfung liegen. Denn es entgingen selbstverständlich einzelne Kolonien, die sich nicht auffallend vom Ausgangsstamme unterschieden, der Beachtung.

Wir griffen daher, um eine feste Form zu gewinnen, zur Züchtung in Bouillon und beimpften mehrere Röhrchen mit je 1 Oese Bakteriophagen und 1 Oese Bazillen. Der Gedanke, daß es sich bei den erzielten Varianten, die ja eine deutliche, teils serologische, teils eine Empfindlichkeitsänderung ihres Verhaltens durch die Bakteriophagenwirkung erfahren hatten, in gewissem Sinne um Vorstufen einer oder mehrerer fester Formen handeln könnte, lag nahe. Wir versuchten daher, durch gleichzeitige Beimpfung frischer Bouillon mit den einzelnen Stämmen und dem Bakteriophagen B_5 die resistenten Keime zu erzeugen.

Die Ausstriche, die in verschiedenen Zeiten angefertigt wurden, ergaben, daß das Auftreten der B_5-festen Keime relativ spät eintritt. B. orig. ergab nach 24 Std. einheitliche, bläuliche, durchschimmernde Kolonien, die in ihrem bakteriophagen Verhalten dem Normalstamm entsprachen. Nach 48 Std. traten vereinzelte opake Kolonien auf, nach 72 Std. waren opake und blaue Kolonien in ungefähr derselben Zahl vorhanden. Nach 196 Std. war das Verhältnis zwischen beiden Kolonieformen dasselbe. Die weitere Untersuchung zeigte, daß die bläulichen Kolonien aus Keimen bestanden, die sich wie der Ausgangsstamm verhielten, während der opake Stamm resistent geworden war. Er war aber gleichzeitig überempfindlich geworden gegen Fl_1k, stimmte also darin mit der früheren labilen festen Form 3ck überein.

Nach einer Zeitdauer, die zwischen 48 und 72 Std. schwankt, gingen auch die übrigen Varianten in eine opake Form über, neben der immer noch sensible Keime, in ihrem Aussehen dem Ausgangsstamm ähnlich, aufgingen. Die opake Form erwies sich als resistent und verhielt sich bakteriophag wie der resistente Stamm, der aus B. orig. gewonnen wurde, das heißt fest gegen B_5 und hochempfindlich gegen Fl_1k. Serologisch geht er im Serum des Ausgangsstammes in groben und feinen Flocken bei einer Spur von Spontanagglutination.

Tab. VI zeigt das Verhalten der Meißelbeck-Varianten gegenüber den beiden Bakteriophagen Fl_1k und B_5. Der Unterschied gegenüber den B-Varianten liegt darin, daß schon der Ausgangsstamm M. orig. gegen den Bakteriophagen Fl_1k hochempfindlich ist. Alle

Tabelle VI.

	Fl_1 k.	Bs
M orig.	+++	+++
M g.	—	—
M h.	+++	±
M i.	+++	—
M d.	+++	—

Varianten behalten diese Sensibilität bei und ändern sich lediglich gegenüber dem Ausgangsbakteriophagen B_5.

Der Stamm Mg entspricht in seinem Verhalten vollkommen dem Ausgangsstamm. Mi und Md erweisen sich beide als resistent gegen B_5. Mh zeigt nur noch Spuren von Einwirkung.

Der Stamm Mg, der, wie schon erwähnt, durch die starke Verschleimung seiner Kolonien von M. orig. abweicht, stellt ein Analogon zu der Variante 3s dar. Auch hier ist die Festigkeit unspezifisch und auf die hemmende Wirkung des Schleimes zurückzuführen. Wie mit 3s, so vermehrt sich auch mit Mg der Bakteriophage relativ gut. Mi, eine zu Rückschlägen neigende Mikroform, die sich serologisch, wie aus Tab. IV ersichtlich ist, wie der Ausgangsstamm verhält, ist bakteriophagenfest geworden, desgleichen Md, eine kulturell und serologisch von Mi vollkommen verschiedene Variante. Wir haben also hier das Auftreten zweier verschiedener fester Stämme vor uns, erzeugt durch den gleichen Bakteriophagen.

Von großem Interesse ist weiter die Variante Mh. In dieser Form tritt uns einer der, wie es scheint, nicht eben seltenen halbfesten Stämme entgegen, die zuerst von Bail als solche erkannt und beschrieben wurden. Die Wirkung von B_5 beschränkt sich auf die Erzeugung weniger kleinster unregelmäßiger Löcher am Rande des Rasens.

Um auch bei Fleischvergifter Meißelbeck die Verhältnisse der Bakteriophagenwirkung in Brühe zu studieren, beimpften wir ein Röhrchen mit M. orig. und B_5. Nach 24 Std. zeigte der Aufstrich der stark getrübten Bouillon vollkommen einheitliche, opake Kolonien vom Typus der Variante Md. Von einer Wirkung des Bakteriophagen ist nichts mehr zu sehen. Nach 48 Std. und 96 Std. ist das Bild unverändert. Diese einheitliche opake Form erwies sich als gefestigt gegen B_5 bei unveränderter Sensibilität gegen Fl_1k.

Die vereinheitlichende Wirkung der Brühe tritt in diesem Versuche ganz besonders hervor. Während im direkten Aufstrich auf die Platte nicht weniger als 4 teils serologisch, teils lysosensibel voneinander abweichenden Keime gezüchtet wurden, ist in der Fleischbrühe in der kurzen Zeit von 24 Stunden von dem gleichen Bakteriophagen aus dem gleichen Ausgangsstamme eine vollkommen einheitliche, stabile, feste Form erzeugt worden.

Zusammenfassung.

An der Hand der Versuche konnte bestätigt werden, daß die Auflösung nur einen besonderen Fall, gewissermaßen ein Extrem der Bakteriophagenwirkung darstellt. Ein großer Teil der Keime, die dem Einflusse eines Bakteriophagen ausgesetzt sind, erfahren eine mehr

oder weniger weitgehende Aenderung ihrer Struktur, die sich in serologischen, bakteriophagenempfindlichen und kulturellen Abweichungen vom Verhalten des Ausgangsstammes dokumentiert. Bei den meisten der erhaltenen Formen handelt es sich nicht um stabile Varianten, nicht um Endpunkte der Beeinflußbarkeit, sondern um Etappen, die bei längerer Einwirkung des Agens in eine oder mehrere einheitliche Formen übergeführt worden. Je länger ein Bakteriophage auf die empfindlichen Bazillen zu wirken vermag, desto einheitlicher werden im allgemeinen die Variationsformen. Wir konnten zeigen, daß der direkte Ausstrich von Bakteriophagen und Bazillen auf Agar, wobei praktisch die kürzeste Einwirkungszeit erreicht wird, in einem weit größeren Maße zur Bildung von Varianten führt, als tagelanger Aufenthalt von Bazillen und Bakteriophagen in der gleichen Bouillon. Wir wiesen weiter bei Paratyphus B den Uebergang verschiedener der erhaltenen Varianten in eine einheitliche, feste Form nach, die kulturell und serologisch vom Ausgangsstamm nicht allzu sehr abweicht. Dabei muß allerdings die relative Labilität der Stämme im Auge behalten werden. Sie neigen fast alle bei längerem oder kürzerem Aufenthalte in Bouillon zu Rückschlägen, und es ist also denkbar, daß man nicht die Varianten als solche, sondern deren Rückschlag zur Ausgangsform sekundär durch den Bakteriophagen in eine einheitliche, stabile, feste Form überführt.

Die gleichen Verlustvarianten wurden früher durch künstliche Mutation aus alternden Bouillonkulturen gezüchtet. Dadurch wird die Vermutung gestützt, daß die Bakteriophagenwirkung in engster Beziehung zur Mutation steht.

Ueber einen gelungenen Nachweis von Paratyphus B-Bazillen im Leitungswasser.

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität Marburg (Lahn) (Direktor: Geh.-Rat Prof. Dr. H. Bonhoff).]

Von Dr. **H. Kapeller.**

Aus dem Kreise Schlüchtern, Bez. Cassel, war im Laufe des Oktober 1924 wiederholt von erkrankten Menschen stammendes Material zur Untersuchung auf Typhus-Paratyphus eingesandt worden, und diese hatte mehrmals zu einem positiven Ergebnis geführt. Immer handelte es sich dabei um Paratyphus B. Am 4. 11. gingen beim hiesigen Untersuchungsamt aus Steinau (Kreis Schlüchtern) mehrere am 3. 11. entnommene, aus Wasserleitungen stammende Wasserproben mit der Bitte um bakteriologische Untersuchung ein. Diese erbrachte den Nachweis von Paratyphus B-Bazillen in einer dieser Proben.

Der Gang der Untersuchung war folgender: Die eingesandten etwa 10 ccm Wasser wurden in einem Spitzglase scharf zentrifugiert und vom ziemlich reichlichen Zentrifugat, nach Abgießen der überstehenden Flüssigkeit, eine Oese auf Endoschen Fuchsinagar ausgestrichen. Von den auf dieser Platte zur Entwicklung gelangten 200—250 Kolonien zeigte nur eine den Charakter der Typhus-Paratyphus-Bazillenkolonien. Die orientierende Agglutination dieser Kolonie mit spezifischem, mit Paratyphus B-Bazillen hergestelltem Serum in einer Verdünnung von 1:100 ergab ein positives Resultat. Nun wurde von dieser Kolonie abgestochen und auf ein Agarröhrchen übertragen. Die auf diese Weise gewonnene Reinkultur erwies sich als eine solche gramnegativer, im hängenden Tropfen eigenbeweglicher, kleiner Stäbchen. Mit dieser wurden die gebräuchlichen Differenzialnährböden: Milch, Lackmusmolke, Neutralrot-Agar und Traubenzuckeragar in hoher Schicht und Gelatine beimpft. Der Stamm (die 3. Generation) zeigte auf diesen alle die bekannten, für den Paratyphus B-Bazillus typischen Wachstumsverhältnisse. Durch spezifisches Paratyphus B-Serum wurde die dritte Generation dieses Stammes gleichfalls bis zur Titergrenze agglutiniert.

Es kann somit kein Zweifel darüber bestehen, daß es hier gelungen ist, Paratyphus B-Bazillen im Leitungswasser nachzuweisen. Es ist dies um so bemerkenswerter, als dieser Nachweis mit den gewöhnlichen Methoden, ohne Fällung oder Filtration größerer Mengen des zu untersuchenden Wassers, gelang und im Orte Steinau selbst in den letzten Jahren überhaupt keine Fälle von Typhus-Paratyphus oder darauf verdächtige aufgetreten sind.

Der vorliegende Fall veranlaßte eine Durchsicht der Literatur, soweit diese zugänglich war, auf ähnliche. Es ergaben sich 37 bekanntgegebene Fälle sicheren Typhus-Paratyphusbazillen-Nachweises im Wasser. Diese sind, zeitlich geordnet, in nachfolgender Tabelle zusammengestellt (s. S. 10).

Auch diese Zusammenstellung, die, wenn auch nicht die gesamte, so doch einen großen Teil der Weltliteratur umfaßt, bestätigt aufs neue die schon wiederholt festgestellte Tatsache der großen Seltenheit eines derartigen Nachweises.

Ferner fällt eine beträchtliche Konstanz der Frequenz der positiven Typhus-Paratyphus-Bazillenbefunde während des ganzen Zeitraumes auf. Da die Methoden des Nachweises der Typhus-Paratyphusbazillen im Wasser in demselben Zeitabschnitt eine wesentliche Steigerung ihrer Leistungsfähigkeit erfahren haben — Kaczynski (28) konnte noch etwa 8 Typhusbazillen im Liter, die sich im Verhältnis von 1:175000 zu anderen Keimen im Wasser befanden, sicher nachweisen — erscheint diese Feststellung überraschend. Gewiß sind die sanitären Verhältnisse in derselben Zeit besser und dadurch im allgemeinen die Gelegenheiten zur Infektion der Wässer seltener geworden. Trotzdem bieten sich diese, die Infektionsgelegenheiten, einerseits sicherlich auch heute noch oft genug und dürfte andererseits die Zunahme der Zahl der bakteriologischen Untersuchungsstellen ohne weiteres den Ausgleich herbeiführen, um so mehr als auch Paratyphusbazillenbefunde mit in die Betrachtung hineinbezogen werden, die, saprophytisch weit verbreitet, zweifellos heute ebenso häufig wie ehedem, besonders in Oberflächenwässer, hineingelangen. Da die obige Zusammenstellung ferner weite exotische Gebiete und solche, die in den letzten Jahren kaum eine wesentliche Besserung der sanitären Verhältnisse erfahren

	Jahr	Art und Herkunft des Materials	Nachgewiesene Mikrobenart	Autor	Bemerkungen
1.	1898	Brunnenwasser aus der Neumark	Bac. typhi	Kübler u. Neufeld (1)	
2.	1898	Leitungswasser, Berlin	dgl.	Loesener (2)	
3.	1899	Brunnenwasser aus Agra (Ind.)	„	Hankin (3)	
4.	1900	Wasser aus 2 Zisternen aus Pécs (Ungarn)	„	Genersich (4)	
5.	1900	Vannewasser (Paris)	„	Hauriot (5)	
6.	1901	Brunnenwasser (Schleswig)	„	Fischer - Flatau (6)	
7.	1901	Leitungswasser aus Olten (Schweiz)	„	Tavel (7)	
8.	1902	Brunnenwasser aus Nagyszeben (Ungarn)	„	Daniel Konrádi (8)	
9.	1902	Brunnenwasser	„	Gärtner (9)	
10.	1903	Leitungswasser (Paris)	„	Bienstock (10)	
11.	1903	Leitungswasser (Detmold)	„	Noetel (11)	
12.	1904	Wasser aus der Moldau und Leitungswasser (Prag)	„	Jaksch u. Rau (12)	
13.	1904	Schlamm eines Erdbehälters	„	Springfeld-Gräve-Bruns (13)	
14.	1904	Wasser eines Springbrunnens Bolchen (Lothringen)	Bac. typhi und paratyphi B.	Conradi (14)	
15.	1904	Trinkwasser aus einer Quelle	Bac. typhi	Gundlach (15)	
16.	1904	Brunnenwasser a. Königslautern	dgl.	Mayer (16)	
17.	1905	Brunnenwasser aus Waitzen (Ungarn)	„	Störzner (17)	
18.	1905	Trinkwasser einer calabrischen Gemeinde	Bac. parat. A.	Baladini-Blaudeni (18)	
19.	1906	Wasser eines Schöpfbrunnens	Bac. typhi	Drigalski (19)	
20.	1906	Brunnenwasser aus Weida	dgl.	Konrich (20)	keine ätiol. Bedeutung
21.	1906	Brunnenwasser aus Reudenz	„	ders. (21)	dgl.
22.	1907	Brunnenwasser	„	Kaiser (21)	
23.	1907	Leitungswasser aus Bergheim (Elsaß)	Bac. parat. B.	Gaethgens (22)	dgl.
24.	1907	Wasser eines Pumpbrunnens aus Straßburg	dgl.	ders. (23)	dgl.
25.	1909	Brunnenwasser	Bac. typhi	Almquist (23)	
26.	1909	„	dgl.	ders. (23)	
27.	1910	„ (Oberhessen)	„	Bötticher (24)	
28.	1910	Oberflächenwasser (England)	„	Jackson and Milia (25)	
29.	1911	Wasser	„	Leuchs (26)	
30.	1911	Wasser eines Schöpfbrunnens Neusess, Reg.-Amt Feuchtwangen	„	Weichardt (27)	
31.	1912	Wasser des Peltewbaches, Hauptsiel von Lemberg	„	Kaczynski (28)	
32.	1913	Brunnenwasser	„	Schopohl (29)	
33.	1914	Trinkwasser von Modena	Bac. parat. A.	Sarti (30)	
34.	1915	Wasser einer Pferdeschwemme einer galizischen Garnison	Bac. typhi	Löwenstein (31)	
35.	1915	Wasser einer Badeanstalt Niederl.-Indien	dgl.	Jennissen (32)	
36.	1916	Brunnenwässer (Visby)	Bac. typhi und paratyphi B.	Petterson (33)	
37.	1922	Leitungswasser (Italien)	Bac. typhi	Pasquale (34)	

haben, umfaßt und in ihr neben Trinkwässern auch Oberflächen- und sogar Abwässer Berücksichtigung finden, erscheint die Annahme eines tatsächlich selteneren Vorkommens der Typhus-Paratyphusbazillen im

Wasser zur Erklärung für ihr gleich selten bleibendes Auffinden in demselben trotz der Verbesserung der Methoden durchaus unberechtigt.

Der Grund für das Versagen auch der modernen Untersuchungsmethoden liegt zweifellos in der Flüchtigkeit des Auftretens der genannten Mikroben im Wasser und der relativ langen Inkubationszeit der durch sie erregten Erkrankungen, deren Ausbruch vorwiegend die Veranlassung zur Wasseruntersuchung abgibt. Denn wenn es auch verschiedenen Autoren gelungen ist, im Experiment noch mehrere Wochen nach der Infektion des Wassers Typhus- und Paratyphusbazillen nachzuweisen, so dürften diese unter natürlichen Verhältnissen sich doch nur eine beschränkte Anzahl von Tagen in demselben halten, was auch durch Wiederholung der Untersuchung nach kurzer Zeit mit negativem Erfolge bei vorher positiven Fällen bestätigt wird. So bleibt dem Zufall weitester Spielraum offen: sind zur Zeit der Entnahme der Wasserprobe Typhus-Paratyphusbazillen in demselben zufällig vorhanden, so werden diese sich, auch mit relativ primitiven Methoden, wie in unserem Falle, nachweisen lassen. Weil aber die Verhältnisse für das die Zusammenstellung umfassende Gebiet in dem betreffenden Zeitraum im allgemeinen dieselben geblieben sind, oder diese, soweit sie sich in der einen Richtung geändert haben sollten, durch Veränderungen, die in entgegengesetzter Richtung wirksam waren, kompensiert wurden, ist auch die Häufigkeit der zu positiven Ergebnissen führenden glücklichen Zufälle, wie zu erwarten, annähernd die gleiche geblieben.

Da nun der vorliegende Fall überhaupt das Zufällige des Erfolges bei einem derartigen Beginnen in so ausgesprochener Weise hervortreten läßt — keine alarmierenden Erkrankungen, sondern die durch eine geringe Trübung augenscheinliche Verunreinigung des Leitungswassers infolge Hochwassers hatte zur Vornahme der Untersuchung geführt; das Aufgehen ausgerechnet einer Paratyphus B-Bazillenkolonie auf der Platte — erschien er ganz besonders der Veröffentlichung wert.

Literaturverzeichnis.

1) Kübler u. Neufeld, Ztschr. f. Hyg. Bd. 31. 1899. — 2) Loesener, Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamt. Bd. 11. — 3) Hankin, Centralbl. f. Bakt. Bd. 26. 1899. — 4) Genersich, ebendas. Bd. 27. 1900. — 5) Hauriot, Ann. d'hyg. publ. et de méd. lég. 1900. Nr. 5. — 6) Fischer u. Flatau, Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. 29. 1901. — 7) Tavel, ebendas. Bd. 33. 1903. — 8) Konrádi, Daniel, ebendas. Bd. 35. — 9) Gärtner, Klin. Jahrb. Bd. 9. 1902. — 10) Bienstock, Hyg. Rundsch. Bd. 13. 1903. — 11) Noetel, Sanitätsber. über die Kgl. Preuß. Armee. 1904. — 12) Jaksch u. Rau, Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. 36. 1904. — 13) Springfeld-Gräve-Bruns, Klin. Jahrb. Bd. 12. 1904. — 14) Conradi, Dtsch. med. Woch. 1904. Nr. 32. — 15) Nach Matthes-Neumann, Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamt. Bd. 24. 1906. — 16) Mayer, Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. 53. 1909. — 17) Störzner, ebendas. Bd. 38. 1905. — 18) Nach Lehmann, ebendas. Bd. 78. — 19) Drigalski, Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamt. Bd. 24. 1906. — 20) Konrich, Ztschr. f. Hyg. Bd. 60. 1908. — 21) Kaiser, Dtsch. Vierteljahresschr. f. öffentl. Gesundheitspfl. Bd. 39. 1907. — 21) Gaethgens, Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamt. Bd. 30. — 23) Almquist, Hyg. Tidskr. 1909. S. 193; Ref. Hyg. Rundsch. Bd. 21. 1911. — 24) Bötticher, Hyg. Rundsch. Bd. 21. 1911 S. 545. — 25) Jackson and Milia, Journ. of inf. dis. Vol. 6; Ref. Hyg. Rundsch. Bd. 21. 1911. — 26) Leuchs, Beil. z. Arch. f. Hyg. Bd. 76. — 27) Weichardt, ebendas. Bd. 76. — 28) Kaczynski, Ztschr. f. Hyg. Bd. 74. 1913. — 29) Schopohl, Veröff. a. d. Geb. d. Medizinalverwalt. Bd. 2. 1913. — 30) Nach Lehmann, Centralbl. f. Bakt. Abt. 1. Orig. Bd. 78. — 31) Löwenstein, Wien. klin. Woch. 1915. S. 998; Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 65. – 32) Jennissen, Geneesk. Tijdschr. v. Nederl. Indie. Deel. 55; Ref. Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Ref Bd. 68. — 33) Petterson, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 82. — 34) Pasqual, Centralbl. f. d. ges. Hyg. Bd. 3. S. 629.

Bemerkungen zu der Erwiderung von Buschke und Kroó auf die Arbeit von Tomioka zur Frage der Immunität bei Recurrens usw. in Bd. 95, S. 188 d. Zeitschr.

[Aus dem serologischen Laboratorium der Bakteriologischen Abteilung des Reichsgesundheitsamtes.]

Von **P. Manteufel**, Berlin-Dahlem.

Da die in der Ueberschrift erwähnte Arbeit von Tomioka auf meine Veranlassung gemacht worden ist, bitte ich, an Stelle des bereits nach Japan zurückgekehrten Autors folgende Bemerkungen zu der Erwiderung von B. und Kr. machen zu dürfen.

Buschke und Kroó halten die technischen Abweichungen Tomiokas von ihrer Methodik für so erheblich, daß die Arbeit nicht als Nachprüfung ihrer Ergebnisse, sondern als neue Arbeit über das gleiche Thema anzusehen sei. Das ist auch meine Meinung, wenn ich in diesem Punkte auch keinen Grund zur Beanstandung erblicken kann. Eine genaue Nachprüfung der einzelnen Versuchsreihen von B. und Kr. habe ich nämlich von vornherein nicht für erforderlich gehalten, da wir an der Richtigkeit dieser Befunde keinen Zweifel hatten und lediglich die Deutung der Ergebnisse unter veränderten Gesichtspunkten und Versuchsbedingungen einer Nachprüfung unterziehen wollten. Von einer „in allen Punkten abweichenden Versuchsanordnung Tomiokas", wie B. und Kr. in ihrer Erwiderung sagen, kann andererseits m. E. nicht wohl die Rede sein. Wie aus den beiden Versuchen der Tabelle V (S. 55) hervorgeht, hat P. nämlich einzelne Versuche auch mit annähernd der gleichen Versuchsanordnung angestellt wie B. und Kr., nämlich mit parenteraler Infektion und unter Behandlung mit kleinen Neosalvarsandosen ($2^1/_2$ mg in geteilten Gaben) 3, 6 und 14 Tage nach dem Erscheinen der Parasiten im Blut. Bei insgesamt 14 Versuchstieren dieser Tabelle wurde dabei nur in 3 Fällen eine abgeschwächte Infektion bei der nachträglichen Gehirnverimpfung erzielt, während in 11 weiteren Fällen keine Anwesenheit von Spirochäten im Gehirn festgestellt wurde. Auch bei diesem Teilergebnis findet sich in einer Beziehung eine Bestätigung der wichtigen Befunde von B. und Kr., in anderer eine Abweichung insofern, als es sich nur um eine Minderheit unvollkommener Heilungen handelt.

Den perkutanen Infektionsmodus haben wir in der Regel gewählt, und zwar deshalb, weil dadurch der subakute Krankheitsverlauf in mehreren Anfällen, wie er beim Menschen gewöhnlich vorkommt, besser nachgeahmt wird, als es bei parenteraler Infektion der Fall ist, und weil wir angenommen haben, daß dadurch auch das Eindringen der

Parasiten in das Zentralnervensystem, was ja nach den Untersuchungen von Plaut und Steiner (Arch. f. Schiffs- und Tropenhygiene 1920, 24, S. 33) beim Menschen in der Regel der Fall ist und auf einer Infektion der Meningen beruht, häufiger als bei parenteraler Infektion eintreten würde. Nach dieser Arbeit von Plaut und Steiner erscheinen die Recurrensspirochäten beim Menschen allerdings erst nach Ablauf des 1. Anfalls im Liquor und treten erst etwa 4 Wochen nach dem 1. Anfall dort mit gewisser Regelmäßigkeit auf. Deshalb ist der Einwand von B. und Kr. nicht unberechtigt, daß ein Teil der Versuche von Tomioka, nämlich die am 1. und 3. Tage nach dem Auftreten der Parasiten im Blut angestellten, unter ungünstigen Bedingungen vor sich gegangen ist, d. h. zu einer Zeit, in der noch keine Spirochäten ins Zentralnervensytem eingedrungen waren. Wie aus dem Text auf S. 49 zu entnehmen ist, hat sich Tomioka diesen Einwand bereits selbst gemacht und deshalb die auf Tabelle IVa und IVb (S. 51 bis 53) mitgeteilten Versuche angestellt, bei denen die Neosalvarsanbehandlung erst 8 Tage, 2 Wochen und 5 Wochen nach dem ersten Auftreten der Parasiten im Blut vorgenommen wurde. In 19 Fällen dieser Tabellen hat die Neosalvarsanbehandlung 15mal eine völlige Ausheilung herbeigeführt, während es 4mal nicht der Fall war. Das wären also nur 21 Proz. Versager der Salvarsanbehandlung gegen bis zu 70 Proz. bei B. und Kr. Wenn diese Autoren bei der parenteralen Infektionsmethode bereits nach 24 Std. mit einer regelmäßigen Anwesenheit der Recurrensspirochäten im Gehirn der Mäuse rechnen, so kann man wohl wenigstens bei den letztgenannten Versuchen Tomiokas den Einwand, daß die Behandlung zu früh stattgefunden habe, als unzutreffend bezeichnen.

Die Angabe von B. und Kr., daß Tomioka die Neosalvarsanbehandlung bereits zu einer Zeit vorgenommen habe, in der die Spirochäten auch in der Blutbahn noch nicht nachweisbar waren und deshalb ihre Anwesenheit im Gehirn schon gar nicht zu erwarten war, ist nach Ausweis der Tabellen ein Irrtum, ebenso der Einwand, daß die perkutane Infektion überhaupt nicht in allen Fällen zum Ziele führt. Diese Feststellung gilt nur für den Infektionsweg durch die mechanisch unverletzte Haut, während T. auf S. 43 ausdrücklich angibt, daß er die mit der Schere von Haaren befreite Haut nach meiner Angabe außerdem mit dem Rasiermesser abgeschabt und infolge der dadurch herbeigeführten Epithelerosionen 100 Proz. Impferfolge bekommen habe.

Die therapeutische Dosis für Mäuse von 20 g beträgt nach dem Handbuch der Salvarsantherapie von Kolle und Zieler (1924) bei Recurrens etwa 3,3 mg Neosalvarsan, die verträgliche Dosis 7,4 mg: Die von B. und Kr. angewandte einmalige Heildosis von 3 mg ist mithin an sich knapp bemessen (was angeblich in ihrer Absicht lag), und es schien deshalb von Wert, festzustellen, wie sich stärkere Heildosen bezüglich der Abtötung der ins Zentralnervensystem eingedrungenen Spirochäten verhalten. Deshalb haben wir außer den unter 3 mg liegenden kleinen auch große Dosen von 5- und 2mal 3mg zur Anwendung gebracht. Dabei hat sich gezeigt, daß auch diese großen Dosen versagen können, und zwar um so häufiger, je später sie angewandt werden. Man sollte meinen, daß auch diese von B. und Kr. beanstandete Abweichung von ihrer Methodik zu einer Erweiterung ihrer Feststellungen beigetragen hat.

Tabelle I.

Maus	1. Tag	2. Tag	10 h a.	3 h p.	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	8. Tag	9. Tag	10. Tag	11. Tag	12. Tag	13. Tag	
A	Infiziert ip. mit Recurrensblut	+++	4 mg Neosalv.	+	0	0	0	—	0	0	0	0	—	0	0	Entblutet: Blut und Gehirn auf Maus A 1—A 3
B		+++	2 mg Neosalv.	+	0	0	0	—	0	0	0	0	—	0	0	Entblutet: Blut und Gehirn auf Maus B 1—B 3
C		+++	1 mg Neosalv.	+++	++	0	0	—	0	0	0	0	—	0	0	Entblutet: Blut und Gehirn auf Maus C 1—C 3
D		+++	0,5 mg Neosalv.	+++	++	0	0	—	0	+	0	0	—	0	0	Entblutet: Blut und Gehirn auf Maus D 1—D 3.

Maus	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	8. Tag	9. Tag	10. Tag	11. Tag	12. Tag	13. Tag	14. Tag	15. Tag	16. Tag	17. Tag	18. Tag	19. Tag
A 1	Inf. mit Blut	0	0	0	0	—	0	0	0	—	0	0	—	0	0	0	nachgeimpft mit Recurrensblut	+	++
A 2	Inf. mit Gehirn	0	0	0	0	—	0	0	0	—	0	0	—	0	0	0		+	†
A 3	Inf. mit Gehirn	0	0	0	0	—	0	0	0	—	0	0	—	0	0	0		+	++
B 1	Inf. mit Blut	0	0	0	0	—	0	0	0	—	0	0	—	0	0	0			
B 2	Inf. mit Gehirn	0	0	0	0	—	0	0	0	—	0	0	—	0	0	0			
B 3	Inf. mit Gehirn	0	0	0	0	—	0	0	0	—	0	0	—	0	0	0			
C 1	Inf. mit Blut	0	0	0	0	—	0	++	+++	—	0	++	—	+++	†	.			
C 2	Inf. mit Gehirn	0	0	0	0	—	0	0	0	—	0	†	—	.	.	.			
C 3	Inf. mit Gehirn	0	0	0	0	—	0	0	+	—	+++	+++	†	.	.	.			
D 1	Inf. mit Blut	0	0	++	+	—	+	+	0	—	+	0	—	+	0	0			
D 2	Inf. mit Gehirn	0	0	0	0	—	0	0	++	—	0	0	—	+	0	0			
D 3	Inf. mit Gehirn	0	0	0	0	—	++	++	+	—	0	0	—	++	0	0			

Das Zeichen — bedeutet, daß an diesem Tage nicht untersucht wurde.

Tabelle II.

Maus	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	8. Tag	9. Tag	10. Tag	11. Tag	12. Tag	13. Tag	14. Tag	15. Tag	16. Tag	
A	Infiziert ip. m. Recurrensblut	+++	+++	+++ 2 mg Neosalv.	—	0	0	0	0	0	—	—	0	0	0	—	Entblutet: Blut und Gehirn auf Maus A 1—A 3
B		+++	+++	+++ 3 mg Neosalv.	—	0	0	0	0	0	—	—	0	0	0	—	Entblutet: Blut und Gehirn auf Maus B 1—B 3.

Maus	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	8. Tag	9. Tag	10. Tag	11. Tag	12. Tag	13. Tag	14. Tag	15. Tag	16. Tag
A 1	Infiz. mit Blut	—	—	0	0	0	+++	++	0	—	++	+	—	—	.	.
A 2	Infiz. mit Gehirn	—	—	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	.	.
A 3	Infiz. mit Gehirn	—	—	0	0	0	0	0	0	—	0	0	++	+	+	+
B 1	Infiz. mit Blut	—	—	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	.	.
B 2	Infiz. mit Gehirn	—	—	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	.	.
B 3	Infiz. mit Gehirn	—	—	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	.	.

Schließlich bin ich in der Lage, hier noch 2 nach Veröffentlichung der Arbeit von Tomioka durch meinen früheren Mitarbeiter Dr. Beger aufgestellte Versuchsprotokolle mitzuteilen, die Tomiokas Ansicht, daß das Zurückbleiben von „Restparasiten" im Gehirn auch bei der von B. und Kr. benutzten Versuchsanordnung (intraperitoneale Infektion und Behandlung mit kleinen Dosen) eine starke Abhängigkeit von der Spätbehandlung und der Benutzung subtherapeutischer Dosen aufweist, ebenfalls durchaus wahrscheinlich machen. Bei Verwendung von 4 und 2 mg Neosalvarsan am 1. Tage nach dem Auftreten der Blutparasiten (Blutbefund + + +) lassen sich durch Verimpfen von Blut und Gehirn der 11 Tage später getöteten Mäuse keine Spirochäten nachweisen, dagegen gelingt das bei Verwendung einer subtherapeutischen Heildosis von 1 und $^1/_2$ mg (Tabelle I). Im 2. Versuch, bei dem die Behandlung mit 2 und 3 mg Neosalvarsan erst am 3. Tage nach dem Auftreten der Parasiten im Blut vorgenommen wurde (Blutbefund + + +), erweist sich durch Abimpfung Blut und Gehirn der 3 mg-Maus steril, bei der 2 mg-Maus dagegen sind sowohl im Blut als auch im Gehirn Spirochäten durch Ueberimpfung nachweisbar gewesen (Tabelle II).

Aus der Erwiderung von B. und Kr. ersehe ich erst in vollem Umfange, von wie verschiedenen Gesichtspunkten aus man an die Bearbeitung aller dieser Fragen herangehen kann. Das gilt beispielsweise für die Frage, ob bei Mäusen eine ausgebildete Recurrensimmunität durch Salvarsantherapie vernichtet werden kann. B. und Kr. geben an, daß es ihnen bei diesen Versuchen daran gelegen habe, eine Versuchsananordnung zu geben, nach welcher eine Superinfektionsmöglichkeit bewiesen werden kann, und haben angeblich deshalb gerade kleine Heildosen gewählt, während uns in erster Linie die Frage interessierte, in welchem Umfange man auch bei der Verwendung von ausreichenden Heildosen mit einer unvollkommenen Sterilisation sowie mit Aufhebung einer vorhanden gewesenen Immunität rechnen muß, bzw. ob eine vorhanden gewesene vermeintliche Immunität verschwindet, wenn die latente Infektion beseitigt ist. Die in diesen Fragen zwischen den Arbeiten von B. und Kr. und Tomioka bestehenden Differenzen sind auch nach meiner Meinung, und darin besteht anscheinend zwischen beiden Parteien Einigkeit, weiterer Aufklärung bedürftig.

Wie aus der von B. und Kr. angezogenen Arbeit von Kudicke, Feldt und Collier (Zeitschrift für Hygiene, Bd. 102. 1924. S. 135) hervorgeht, die berichten, daß beim Menschen die antigenen Eigenschaften der Recurrensspirochäten bereits während des Anfalles eine Aenderung im Sinne der Rezidivstammbildung erfahren können, daß ferner die antigenen Eigenschaften der Liquorspirochäten fast stets andere sind als die Blutspirochäten zur gleichen Zeit der Untersuchung, scheinen die Immunitätsverhältnisse bei dieser Krankheit leider bei weitem nicht so einfach zu liegen, wie es B. und Kr. zu Beginn ihrer Arbeit angenommen haben. Da K., F. und C. auch vor einer Uebertragung der Ergebnisse bei Recurrens auf die Verhältnisse bei Syphilis warnen, dürfte eine weitere Bearbeitung des Problems bei experimenteller Syphilis, wo es auch mehr praktische Bedeutung besitzt, manche Vorzüge haben. Solche Versuche sind bei mir im Gange.

Was die Zerstörung der Immunität durch Salvarsan anlangt, so drückt sich Reiter in der von B. und Kr. angezogenen Arbeit sehr vorsichtig aus und findet jedenfalls als Regel, daß die nachträgliche Behandlung mit spirilloziden Mitteln die Immunität nicht zerstört (Centralbl. f. Bakt. Abt. 1. Orig. Bd. 92. 1924. S. 539 oben).

Ein Beitrag zur Biologie des Bac. pyogenes.

(Vorläufige Mitteilung.)

[Aus dem Veterinär-Hygienischen Institut der Universität Leipzig (Dir.: Obermedizinalrat Prof. Dr. M. Klimmer).]

Von **H. Haupt, H. Hörig** und **R. Haupt,** sämtlich in Leipzig.

Bei den Paarzehern spielt der Bac. pyogenes als Eitererreger wohl die größte Rolle. Hinsichtlich der Geschichte unserer Erkenntnisse über dieses Bakterium sei auf Glages Abhandlung in Kolle und Wassermanns Handbuch der pathogenen Mikroorganismen (Bd. 6, S. 172) verwiesen. Der Bac. pyogenes hat eine ziemlich erhebliche Bedeutung bei den Lungenentzündungen der Paarzeher (Schweineseuche (Grips), Schafrotz und Rinderpneumonie), bei der Euterentzündung der Rinder (Glage u. a., eigene Beobachtungen) und bei den Gebärmutterentzündungen der Rinder [Peter (1) u. a., eigene Beobachtungen].

Die zu unseren Versuchen benützten Stämme waren teils aus Gebärmutterausfluß, teils aus der Lunge eines Schweines in Reinkultur gewonnen worden. Aus dem Gebärmutterausfluß zweier Rinder eines Bestandes, die Pyometren aufwiesen, wurden die Stämme Bac. pyogenes Rind I und Bac. pyogenes Rind II gezüchtet, während ein 3. Stamm Bac. pyogenes Schwein aus der Lunge eines jungen Schweines stammte. Der Kadaver dieses Schweines war mit dem Vorberichte eingeliefert worden, daß es zu einem Wurfe gehöre, aus dem bereits mehrere verendet waren. Als Todesursache konnte eine außerordentlich heftige eitrige Lungenentzündung festgestellt werden, die fast das gesamte Lungengewebe ergriffen hatte und vorwiegend auf einer Infektion mit dem Bac. pyogenes beruhte (nebenher bestand noch eine Tuberkulose der Rachenschleimhaut und der Lymphknoten bis herab zum Bronchiallymphkoten, in geringem Maße auch der Lungen). Aus Abstrichen von Schnittflächen wuchs der Bac. pyogenes in Reinkultur. Aus dem eitrigen Schleim der Gebärmutterausflüsse wurden die Stämme über die Serumagarplatte gewonnen.

Die mikroskopische Untersuchung bot keine Schwierigkeiten. Der Bac. pyogenes verhielt sich bei der von uns verwendeten Technik der Gram-Färbung nach Jensens Angaben als gramfest. Hinsichtlich der Form konnten wir den aus dem Schrifttum bekannten Polymorphismus, namentlich hinsichtlich der Länge und der Anordnung,

sowie die durchgehends als sehr fein geschilderte Dicke bestätigen. Von kokkenähnlichen (nicht länger als dick) bis zu schlanken (dem Schweine-Rotlaufbazillus ähnlichen) Formen waren alle Uebergänge feststellbar. Die längeren waren vielfach leicht gekrümmt. Die Anordnung war zumeist einzeln, mehrfach in Ketten oder Haufen liegend. Im Eiter waren alle Formen nachweisbar, in künstlichen Kulturen wuchs im großen ganzen keine Form bevorzugt auf diesem oder jenem Nährboden.

Die Züchtung des Bac. pyogenes auf künstlichen Nährböden stößt auf gewisse Schwierigkeiten. Auf den gewöhnlichen (Fleischwasser-Pepton-) Nährböden wächst er in 1. Generation aus dem Tierkörper, nicht mehr jedoch in den folgenden Generationen (wenn das mitübertragene tierische Material verdünnt wird). Zusätze von Serum oder Blut zu den gewöhnlichen Nährböden machen sie zur Züchtung geeignet. Andererseits gilt Milch als ein sehr gutes Nährsubstrat. Diesen beiden Möglichkeiten der Züchtung wandten wir zunächst unsere Untersuchungen zu und konnten die Angaben früherer Untersuchungen (Schrifttum bei Glage) bestätigen.

Hierbeit stellten wir, unabhängig von Brown und Orcutt (2), deren Angaben uns erst später zugänglich wurden, fest, daß in Blutagarplatten (Bazillen dem flüssigen Agar beigemengt) um die aufgegangenen Kolonien eine Aufhellung des undurchsichtigen Nährsubstrates auftrat. Dieser hämolytische Hof hatte nach 48 Std. einen Durchmesser von etwa 1—2 mm. Die bei dünner Aussaat aufgehenden Kolonien in der Tiefe des Agars hatten ausgesprochene Wetzsteinform, waren von bräunlich-gelber Farbe und makroskopisch deutlich sichtbar (bis zu 1 mm Längsachse). Im Anfang glaubten wir nicht, daß es sich überhaupt um Bac. pyogenes handelte, sondern nahmen an, daß die fraglichen Kolonien einer zufälligen Verunreinigung zugehörten. Die mikroskopische Untersuchung sowie ein Aufstrich auf Schrägnährboden (Levinthal-Agar) erwies die einwandfreie Identität mit dem Ausgangsmateriale, Bac. pyogenes. Bei dichter Aussaat ist die Hämolyse diffus. Auf schrägerstarrtem Blutagar ist im dünneren oberen Teile der Schräge ebenfalls die Hämolyse deutlich zu erkennen. Der Kulturbelag auf Blutagar ist zusammenhängend, körnig, glänzend und durchscheinend. In Blutbouillon wächst er ebenfalls gut unter Lösung der roten Blutkörperchen und bildet einen weißlichen Bodensatz. Die von uns verwendeten Blutnährböden wurden in der üblichen Weise durch Zusatz von 10 bis 20 % sterilen defibrinierten Blutes zu den gewöhnlichen (Fleischwasser-Pepton-) Nährböden hergestellt. (Den Agar verflüssigten wir und kühlten ihn dann vor dem Zusatz des defibrinierten Blutes auf etwa 45° C ab). Zur Verwendung kam defibriniertes Schaf- und Pferdeblut, in einigen Fällen auch Kaninchenblut (nicht defibriniert), ohne daß ein Unterschied im Wachstum oder in der Hämolyse festgestellt werden konnte.

Im weiteren Verlaufe der Untersuchungen versuchten wir, von der Arbeitshypothese ausgehend, daß einem unter aëroben und anaëroben Bedingungen gleich gut wachsenden Bazillus solche Nährböden besonders zusagen würden, die ohne besonderen Sauerstoffabschluß auch Anaërobiern gute Wachtumsbedingungen gewähren, die verschiedenen zur Anaërobenzüchtung gebräuchlichen Organbrei- und Organstück-Nährböden zur Züchtung des Bac. pyogenes. Hierbei erwies sich die Tarozzi brühe — hergestellt aus Leber getöteter Hunde und geschlachteter Rinder anstelle der ursprünglich empfohlenen Meerschweinchenleber —

als ein sehr brauchbarer Nährboden. Die Brühe selbst bleibt klar, die Bazillenmasse bildet einen weißlichen Bodensatz. Das Papierfiltrat ist durch die Bakterien gleichmäßig und deutlich getrübt. In ähnlicher Weise bewährten sich der v. Hiblersche Hirnbrei, der Robertsonsche Ochsenherz- (3) und der Holmansche Rinderfleischbrei (4) als gute Nährböden, ohne jedoch wegen ihres geringen Flüssigkeitsgehaltes zur Gewinnung größerer Bakterienmengen benutzt werden zu können. Weiterhin erwies sich auch der von Hilda Hempl-Heller (5) empfohlene Leberagar als ein leidlich guter Nährboden. Bei dem Blutreichtum der zur Tarozzibrühe anfangs allein verwendeten Leber getöteter Hunde war es naheliegend, auch Blutkochnährböden in den Bereich unserer Untersuchungen einzubeziehen. Es stellte sich hierbei heraus, daß der Levinthalsche, für Influenzabazillen empfohlene Agar einen vortrefflichen Nährboden für den Bac. pyogenes darstellt. Die Herstellung ließ sich für den Bac. pyogenes auch noch insofern vereinfachen, daß entgegen den Angaben Levinthals für den Bac. influencae eine nachträgliche Sterilisation des gekochten, vom geronnenen Blute befreiten und abgefüllten Agars das Wachstum nicht beeinträchtigte. Späterhin erwies sich auch eine Fällung des Blutes im Autoklaven (10 Min. 110°) — jedoch nicht im Dampftopf — als gleichwertig dem Aufkochen in der Flamme. Auf dem Levinthal-Agar zeigte sich bereits nach 24 Std. ein deutliches Wachstum in Form feinster, durchscheinender, glasheller, dicht beisammenstehender, fast zusammenfließender, punktförmiger Kolonien. Der Belag ist vollständig durchscheinend und bleibt dies auch nach weiteren 24 Std. bei 37°. Von Interesse war es nun festzustellen, auf welchem Anteil des Blutes die Förderung des Wachstums beruhe. In dieser Hinsicht sind unsere Untersuchungen noch nicht abgeschlossen. Von Interesse ist es jedoch, daß z. B. auf den bisher verwendeten Gallennährböden nur ein äußerst spärliches, auf einem Spinatnährboden hingegen ein sehr gutes Wachstum erfolgt ist. In gleicher Weise zeigte sich in einem Rinderkotbrei ein gutes Wachstum. Ein in entsprechender Weise wie Levinthal-Agar mit hämoglobinfreiem Serum hergestellter Nährboden erwies sich als wenig günstig, während ein mit gewaschenen Blutkörperchen sowie mit einer durch Kochen von Blutmehl in Natron hergestellten Lösung (Hämatin?) bereiteter Levinthal-Agar sich als gutes Nährsubstrat erwies. Es scheint also der wachstumsfördernde Bestandteil des Levinthal-Agars den Erythrozyten zu entstammen. Man könnte wohl an die Wirksamkeit bestimmter Pyrrolverbindungen denken (Hämoglobin, Chlorphyll), es würde jedoch bei der offenbaren Wachstumsbegünstigung durch die verschiedenartigsten Substanzen organischer Natur (Milch, Pflanzenteile, tierische Gewebsteile) auch die Annahme von Vitaminen nicht von der Hand zu weisen sein. Es wird versucht, in diese interessanten Lebensverhältnisse durch weitere Untersuchungen einen Einblick zu gewinnen.

In ähnlicher Weise wie Blut hat sich auch Milch als ein sehr guter Nährboden für den Bac. pyogenes erwiesen. Da nach verschiedenen Angaben, die wir in einigen Untersuchungen bestätigen konnten, namentlich der Kaseinanteil der Milch sich als das begünstigende Nährsubstrat erwiesen hatte, so versuchten wir den gewöhnlichen Agar durch Zugaben von Kaseinlösungen (in wässerigen Na_2HPO_4-, NaOH- und Natriumzitrat-Lösungen) mit sehr befriedigendem Erfolge zu ergänzen. Auch der von Ayers und Johnson (6)

als Nährboden für Stammkulturen, namentlich auch für Streptokokken empfohlene Kaseinagar (mit höherem Agargehalt und schräg erstarrt) erwies sich als brauchbar. Andererseits versuchten wir auch durch Zusatz von Zitraten, Oxalaten, sowie Phosphaten zur Milch [Brown and Howe (7)] klare Milchlösungen zu erreichen, aus der wir teils feste, teils flüssige Nährböden herstellten. Ungekochte (albuminhaltige) und gekochte (albuminfreie) Molken erwiesen sich in gleicher Weise als unbrauchbar für die Kultur des Bacillus pyogenes. Auch diese Möglichkeit, einen Einblick in die Lebensbedingungen des Bacillus pyogenes zu erreichen, ist gegenwärtig Gegenstand eingehender Untersuchungen.

Soweit also unsere bisherigen Erfahrungen reichen, ist es möglich, den gewöhnlichen Nährböden durch Zusatz von verschiedenem organischen Materiale Stoffe zuzuführen, die das Wachstum des Bac. pyogenes begünstigen. Hierfür erscheint das Blut als das geeignetste Gewebe. Diese wachstumsfördernden Stoffe sind im nativen und koagulierten Serumeiweiß enthalten, gehen jedoch beim Kochen nicht in die Nährsubstrate über, sondern werden mit dem koagulierten Eiweiße auf dem Filter zurückgehalten, der von den Gerinnseln befreite Nährboden ist zur Züchtung des Bac. pyogenes nicht geeignet. Hingegen gehen beim Kochen von gewöhnlichen Nährböden mit defibriniertem Blut, mit Blutkörperchen oder mit Lösungen von Blutmehl in Natronlauge (Hämatin?) Nährstoffe in die Nährböden über, die die gewöhnlichen Nährsubstrate für die Züchtung des Bac. pyogenes geeignet machen. Berücksichtigt man hierbei die Tatsache, daß der Bac. pyogenes im allgemeinen auf den ungekochten (serumhaltigen) Nährböden erst nach 2 Tagen ein deutliches Wachstum zeigt, während er z. B. auf dem Levinthalschen bereits nach 24 Std. voll ausgewachsen erscheint, so ist wohl anzunehmen, daß durch die Erhitzung hämoglobinhaltiger Gewebe, Zellen oder Lösungen beim Kochen (Flamme oder Autoklav) Stoffe abgespalten werden, die den Pyogenes-Bazillen mehr oder weniger unmittelbar als Nährsubstrat dienen können, daß hingegen das native Eiweiß erst durch mitübertragenen Nährboden, Enzyme oder ältere Bakterien, kurz durch das alte Kulturmaterial als Nährstoffquelle erschlossen wird. Nach unseren bisherigen Untersuchungen dürfte es sich dabei um Derivate von Pyrrolverbindungen handeln. Der das Wachstum des Bac. pyogenes fördernde Anteil der Milch scheint nach den bisherigen Erfahrungen das Kasein zu sein, eine Annahme, die wir durch unsere Untersuchungen an gewöhnlichen Nährböden mit Zusätzen von verschiedenen Lösungen von Kasein bestätigen können. Daß auch hier wohl Abbaustoffe des Kaseins eine Rolle spielen dürften, konnten wir durch gutes Wachstum auf einem aus klarem Schweizerkäseextrakt bereiteten Nährboden belegen. Hingegen erwies sich ein mit Weichkäse bereiteter Extrakt als nicht günstig. Der Abbau ist hier wohl bereits zu weit vorgeschritten gewesen. Da die Chemie des Kaseins noch nicht allenthalben klargelegt ist, so dürften sich hier Erklärungsversuche als nur schwach begründet herausstellen.

Hinsichtlich der Veränderung des Nährbodens durch den Bac. pyogenes konnten wir feststellen, daß er die Wasserstoffionenkonzentration in Tarozzi-Brühe erhöht. In einem Versuche stieg sie in Pausen von je 24 Std. untersucht von pH 6,8—7,0 auf 6,6; 5,8; 5,4 und erreichte nach 96 Std. pH 5,2. In anderen Versuchen mit Tarozzi-Brühe von pH 7,4; 7,0; 6,6 und 6,2 stieg die H·-Kon-

zentration bis zum 7. Tage durchgehends auf pH 5,4—5,6, so daß diese Konzentration etwa die obere Grenze darstellen dürfte, bei der Wachstum in diesem Medium noch stattfindet.

Eine Anhäufung von giftigen Stoffwechselprodukten in den Nährmedien konnten wir nicht nachweisen. Durch Ausschleudern von Bazillen befreite drei- bis mehrtägige Tarozzi-Brühe löste in Gaben von 1 ccm subkutan oder 0,1—0,5 ccm intraperitoneal bei der weißen Maus keinerlei Krankheitserscheinungen aus (vorübergehende Beschleunigung der Atmung war auf die verhältnismäßig große Menge der injizierten Flüssigkeit zurückzuführen).

Die Pathogenität des Bac. pyogenes für kleine Versuchstiere prüften wir unter Verwendung von Stamm Rind I an der weißen Maus und am Meerschweinchen. Ueberdies konnten wir bei Immunisierungsversuchen an Kaninchen einige Beobachtungen anstellen. Zunächst erhielten je 2 weiße Mäuse intraperitoneal:

0,2 ccm 1proz. Milchsäure: beide überlebten;

0,2 ccm 1-proz. Milchsäure und sofort anschließend 0,2 ccm einer ziemlich dichten Aufschwemmung von Bac. pyogenes: Beide sterben nach 24 bzw. 30 Std. (im Herzblute Bac. pyogenes);

0,2 ccm der dichten Aufschwemmung von Bac. pyogenes: die eine Maus war nach 30 Std. tot (im Herzblut Bac. pyogenes), die andere starb 16 Tage nach der Infektion und wies eine eitrige (durch Bac. pyogenes verursachte) Peritonitis auf.

Bei weiteren Versuchen, mit einer Aufschwemmung von Bac. subtilis (anstelle der Milchsäure) die Infektion sicherer zum Haften zu bringen, erwies sich die sehr dicht gewählte Aufschwemmung von Heubazillen selbst als pathogen. Beide mit Bac. subtilis sowie eine damit und mit Pyogenes infizierte Mäuse starben innerhalb 24 Std. nach der Infektion (im Herzblute zahlreiche Subtilis-Bazillen). Die 2. der mit beiden Bakterienarten infizierten Mäuse starb erst nach 9 Tagen und wies eine eitrige Peritonitis (verursacht durch Bac. pyogenes, Bac. subtilis nicht nachweisbar) auf.

Die in diesem Versuche festgestellte, das Haften der Infektion begünstigende Wirkung der Milchsäure wurde in einem Versuche am Meerschweinchen bestätigt: Zwei Meerschweinchen erhielten intramuskulär je 2 dreitägige Schrägagarkulturen (in steriler NaCl-Lösung aufgeschwemmt), eins der beiden überdies 1 ccm 1proz. Milchsäure. Eine Kontrolle mit Milchsäure allein hielten wir angesichts der geringen Menge (vgl. obige Mäuseversuche) für entbehrlich. Während das erste Meerschweinchen eine nur vorübergehende Schwellung an der Impfstelle aufwies, entwickelte sich bei dem zweiten eine fortschreitende starke heiße Schwellung, die sich am 6. Tage nach der Infektion vom Kniegelenk bis zur Plantarfläche des Schenkels erstreckte. Im weiteren Verlaufe bildete sich ein offenes Geschwür, das gesamte Gewebe vom Kniegelenk abwärts starb ab, so daß 18 Tage nach der Infektion das Tier getötet werden mußte. An der abgestorbenen und vollständig bloß liegenden Tibia hing der tote Fuß; irgendwelche allgemeinen Beschwerden schienen nicht zu bestehen. Bei der Zerlegung wurde parenchymatöse Degeneration der Nieren und der Leber, sowie Milzschwellung festgestellt. Die aus den inneren Organen angelegten Kulturen blieben steril. Im Abszeßeiter der Impfstelle (kurz nach dem Aufbrechen und nach dem Töten) waren mikroskopisch Pyogenes-Bazillen nachweisbar. Kurz nach dem Aufbrechen des Abszesses gelang auch Reinkultur.

Ein weiteres Meerschweinchen wurde intrapleural mit 1 Schrägagarkultur (in NaCl aufgeschwemmt) infiziert. Das Tier starb nach 16 Tagen und zeigte bei der Zerlegung an der Seite der Infektion einen bohnengroßen Abszeß an der Pleura (hier mit Pleura pulmonalis verwachsen), 2 hirsekorngroße Abszesse neben der Wirbelsäule, 1 erbsengroßen Abszeß einer Rippe und zahlreiche hanfkorn—hirsekorngroße Abszesse der Lunge. Am Herzen befanden sich fibrinöse Auflagerungen. In den eitrigen Prozessen wurden Pyogenes-Bazillen mikroskopisch und durch die Kultur nachgewiesen.

Bei den von uns vorgenommenen Immunisierungsversuchen an Kaninchen erwiesen sich die von uns thermisch (45 Min. bei 52° C) abgetöteten Bazillenaufschwemmungen als vollständig unschädlich. Verwendet wurden der Stamm Bac. pyogenes Rind I und Bac. pyogenes Schwein. Die höchsten verwendeten Gaben betrugen 7,5 ccm einer doppelt so dichten Aufschwemmung, wie als Antigen für Agglutination üblich ist, d. h. gewöhnliche Schrift war gerade durch eine 2 cm hohe Schicht lesbar. Eins der mit abgetöteten Bazillen des Stammes Rind I (dreimal in Abständen von 3—5 Tagen, hierauf noch einmal nach einer Zwischenzeit von 13 Tagen intravenös mit steigenden Gaben) vorbehandelten Kaninchen sowie ein nicht vorbehandeltes wurden 7 und 14 Tage nach der letzten Vorbehandlung mit je einer halben und einer ganzen Schrägagarkultur (Levinthal-Agar) intravenös infiziert. Anfangs zeigten die Tiere keinerlei Krankheitserscheinungen. Nach 14 Tagen begann das nicht vorbehandelte, nach weiteren 14 Tagen das vorbehandelte Kaninchen an Gewicht zu verlieren. Das erstgenannte wurde 57 Tage nach der ersten Infektion moribund getötet, das vorbehandelte starb 63 Tage nach der ersten Infektion. Der Zerlegungsbefund bei dem ersten war vollständig negativ; der Kadaver war vollständig abgemagert. Das vorbehandelte ließ hingegen in Uebereinstimmung mit den Angaben von Brown und Orcutt je einen Abszeß an einer Rippe und am 2. Brustwirbelkörper erkennen. Auf den Herzklappen fanden sich fibrinöse Auflagerungen. Der Kadaver war ebenfalls stark abgemagert. In den etwa hanfkorngroßen Abszessen waren mikroskopisch Pyogenes-Bazillen nachweisbar. Bei beiden Kaninchen bestand Ohrräude; beim zweiten war das innere Ohr ergriffen; neben plumpen Stäbchen waren Pyogenes-Bazillen in dem eitrigen Inhalt der Schnecke nachweisbar. Die Immunisierungsversuche sind gegenwärtig noch nicht abgeschlossen. Die Agglutination bietet Schwierigkeiten, da in den Aufschwemmungen starke Autoagglutination auftritt. Sie sowohl wie die Versuche über die Pathogenität des Bac. pyogenes für kleine Versuchstiere sind Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Im vorliegenden werden Versuchsergebnisse vorläufig mitgeteilt, von denen hervorzuheben ist, daß sich der Bac. pyogenes auf gewöhnlichen, mit verschiedenen organischen Substanzen gekochten Nährböden zu vermehren vermag. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß die wachstumsfördernde Eigenschaft solcher organischer Zusätze auf Vitamine oder besondere Abbaustufen, vielleicht zum Teil der Pyrrolverbindungen, zurückgeführt werden kann. Der das Wachstum des Bac. pyogenes fördernde Anteil der Milch hingegen ist wahrscheinlich das Kasein. Die verwendeten Stämme des Bac. pyogenes lösen Erythro-

zyten in der Blutagarplatte und in Blutbouillon. Verimpft man gleichzeitig mit dem Bac. pyogenes kleine Mengen einer 1proz. Milchsäure, so wird das Haften der Infektion sowie der Fortschritt der Impfkrankheit bei Maus und Meerschweinchen gefördert. Der Agglutination stehen Schwierigkeiten durch Autoagglutination des Bac. pyogenes entgegen.

Schrifttum.

1. Peter, Bakterienflora des Fluor albus des Rindes. [Inaug.-Diss.] Hannover 1921. — 2. Brown and Orcutt, A study of Bac. pyogenes. (Journ. experim. Med. Vol. 32. 1920. p. 219.) — 3. Robertson, Journ. Path. and Bact. Vol. 20. 1916. p. 327. [zit. nach Holman (4)]. — 4. Holman, The value of a cooked meat medium for routine and special bacteriology. (Journ. Bact. Vol. 4. 1919. p. 149.) — 5. Hempl-Heller, Principles concerning the isolation of anaërobes. (Ibid. Vol. 6. 1921. p. 460.) — 6. Ayers and Johnson, A medium for stock cultures, for streptococci and other bacteria. (Ibid. Vol. 9. 1924. p. 111.) — 7. Brown and Howe, Transparent milk as a bacteriological medium. (Ibid. Vol. 7. 1922. p. 511.)

Ueber die neue Serodiagnostik der Syphilis nach Sachs-Klopstock.

[Aus dem hauptstädtischen hygienischen und bakteriologischen Institut in Budapest (Direktor: Prof. Dr. B. Vas).]

Von Dr. **Edmund Strószner**, Direktor-Stellvertreter.

In der 10. Tagung der „Deutschen Vereinigung für Mikrobiologie“ (Göttingen 1924) haben H. Sachs und A. Klopstock eine neue Methode der Seradiagnostik der Lues mittels Ausflockung angegeben, bei deren Ausarbeitung ihnen zum Teil auch Ohashi zur Seite stand.

Die Gründe, die sie zu einer Verbesserung der bisher üblichen Methodik der Flockungsreaktion nach Sachs-Georgi veranlaßten, waren zweierlei. Einerseits kann die Frühablesung in der bisherigen Form zufolge der unter Umständen auftretenden unspezifischen reversiblen Frühflockung zu Trugschlüssen führen, andererseits ist die endgültige Ablesung verhältnismäßig erst spät möglich.

Die Frühflockung kann zwar durch rasche Extraktverdünnung hintangehalten werden, indes leidet hierdurch die Empfindlichkeit. Diesem Nachteil kann durch die Anwendung von sog. Verstärkern abgeholfen werden, und als ein solcher Verstärker dürfte der von Meinicke bei seiner Trübungsreaktion angewendete Tolubalsam anzusehen sein, demgegenüber das von französischen Autoren benutzte Benzoeharz nicht nur ebenbürtig ist, sondern noch den Vorzug besitzt, daß bei seiner Verdünnung Temperatureinflüsse weit weniger eine Rolle spielen als bei der Verdünnung des Tolubalsams.

Sachs und Klopstock empfehlen also außer der raschen Verdünnung des Extraktes denselben vorher noch mit Benzoeharz zu versetzen, dessen gehörige Menge natürlich vorher noch bestimmt werden muß. Die so durch Mischen von cholesteriniertem Rinderherzextrakt

mit der alkoholischen Lösung von Benzoeharz gewonnene Flüssigkeit wird Benzocholextrakt genannt und mit dieser die Flockungsreaktion angestellt.

Dem Cholesterin kommt nach Sachs und Klopstock bei der neuen Reaktion insofern noch eine nennenswerte Rolle zu, als es eine leichtere Löslichkeit des Benzoeharzes nach der Verdünnung des Extraktes mit der physiologischen Kochsalzlösung bewirkt und somit die Verwendbarkeit größerer Dosen von Benzoeharz ermöglicht, wobei natürlich auch noch die bekannte reaktionsbeschleunigende Wirkung des Cholestearins begünstigend ins Gewicht fällt. Nach Versetzen des Serums mit dem Benzocholextrakte wird mit dem Schüttelapparate geschüttelt, was nach Sachs und Klopstock gleichfalls als „beschleunigendes Moment" zu betrachten ist.

Um bei meinen Versuchen mit entsprechenden und tadellosen Reagentien arbeiten zu können, wandte ich mich an Prof. H. Sachs, der die Güte hatte, mir sowohl cholesterinierten Rinderherzextrakt als auch die darauf eingestellte Benzoeharzlösung zu senden und die bei dieser neuen Flockungsreaktion einzuhaltenden Richtlinien mitzuteilen.

Da nach Sachs und Klopstock die Mischung von Extrakt und Benzoeharzlösung nur acht Tage haltbar ist, geben sie zwei Stammlösungen ab, und zwar den cholesterinierten Rinderherzextrakt und die alkoholische Benzoeharzlösung. Der Rinderherzextrakt hält sich nach Sachs und Klopstock unbegrenzte Zeit, die Benzoeharzlösung mindestens 2 Monate lang gebrauchsfähig.

Diese Lösungen werden vorher aufeinander eingestellt, so daß das Mischen in bestimmtem Verhältnis den sogleich gebrauchsfähigen Extrakt ergibt. Von den mir zur Verfügung gestellten Extrakten war bei zweien das Mischungsverhältnis 10,0 Extrakt auf 3,0 Benzoeharzlösung, bei dem dritten 10,0:3,5.

Der Gang der Reaktion ist nun nach Sachs-Klopstock folgender:

„I. Extraktverdünnung. Die Benzocholextrakte werden mit 19 Teilen phys. Kochsalzlösung (0,85proz.) 20fach rasch verdünnt. Man gibt in eine Flasche 9,5 ccm phys. Kochsalzlösung, füllt eine Pipette mit 0,5 ccm Benzocholextrakt, bringt sie unter Fingerverschluß des oberen Endes auf den Boden der Flasche und bläst den Extrakt rasch in die Kochsalzlösung. Durch mehrmaliges rasches Aufsaugen und Ausblasen wird die Mischung hergestellt. Die Einfüllung der derartig bereiteten Extraktverdünnung muß sofort so rasch als möglich geschehen, weil die Extraktverdünnung beim Stehen ausfällt. Es empfiehlt sich vorläufig nicht mehr als 10 ccm Extraktverdünnung auf einmal herzustellen.

II. Versuchsanordnung. Je 0,1 ccm des inaktivierten unverdünnten Serums werden in Reagenzgläser von etwa 10 cm Länge und etwa 10 mm Lichtweite gefüllt. Dazu kommen so rasch als möglich je 0,5 ccm der unmittelbar vorher hergestellten Extraktverdünnung.

Die derart gefüllte Reagenzgläser enthaltenden Ständer werden 10 Minuten lang im Schüttelapparat geschüttelt. Es kann dann sofort abgelesen werden. Eine 2. Ablesung kann nach 30 Minuten langem Brutschrankaufenthalt erfolgen. Die überwiegende Mehrzahl der positiven Sera zeigt bereits nach 10 Min. langem Schütteln im Schüttelapparat starke Ausflockung. Steht ein Schüttelapparat nicht zur Verfügung, so sind die die Reagenzgläser enthaltenden Gestelle mindestens 1 Min. lang, besser länger, mit der Hand kräftig zu

—

schütteln. Darauf folgt die 1. Ablesung. Die 2. und endgültige Ablesung erfolgt nach 30 Min. bis 1 Std. währendem Brutschrankaufenthalte.

III. Beurteilung. Die Beurteilung erfolgt durch Feststellung der Flockenbildung, ebenso wie die makroskopische Beurteilung der Agglutination. Nach 30 Min. langem, bzw. 1stündigem Brutschrankaufenthalte kann man die Reaktion auch leicht im Agglutinoskop ablesen, weil eine allmähliche Aufhellung der negativen Extrakt-Serumgemische eintritt.

Die Flocken sedimentieren rasch, so daß bei der 2. Ablesung in der Regel die Flüssigkeit geklärt ist und das Präzipitat am Boden liegt."

Im Laufe meiner Untersuchungen machte ich nun obige Technik betreffend folgende Beobachtungen: Die Mischung von Extrakt und Benzoeharzlösung ging während 2 Monaten ganz glatt vor sich, als auf einmal sofort nach dem Mischen eine recht starke Flockenbildung sich einstellte, so daß die Reaktion nicht durchführbar war. Diesen Zwischenfall, über den ich Sachs berichtete, beobachteten — wie ich aus den später erschienenen Publikationen ersah — auch andere. Die Ursache ist — wie mir Sachs mitteilte, und worauf er und Klopstock in einem kurzen Bericht in der „Klinischen Wochenschrift" die Untersucher aufmerksam machten — darin zu suchen, daß die Benzoeharzlösung „an und für sich Alterationen erfahren kann, die ihre Gebrauchsfähigkeit zeitlich einschränken".

Auf die Wichtigkeit dieser Tatsache sei daher besonders hingewiesen, bei der Benutzung einer mehr als 2 Monate alten Benzoelösung ist auf die Möglichkeit einer Spontanflockung zu achten. Die Empfehlung, nicht mehr als 10 ccm Extraktverdünnung auf einmal herzustellen, kann ich zugunsten der Technik der Reaktion dahin erweitern, daß man davon ohne jedweden Nachteil 20—30 ccm auf einmal herstellen kann. Ich habe dabei niemals Mißerfolge gehabt und kann mich daher der Meinung von E. Pieper nicht anschließen, der „in der Umständlichkeit der Extraktverdünnung, die immer nur zu 0,5 ccm vorgenommen werden darf, und in der hohen Empfindlichkeit der Verdünnungen im Betriebe mit großen Untersuchungsziffern Störungen sieht". Ich habe fast immer für 40—60 Sera die Benzocholverdünnung, also 20—30 ccm — auf einmal hergestellt und hievon niemals einen nachteiligen Erfolg gesehen. Selbst wenn ich die Verdünnung eine Zeitlang stehen ließ, beobachtete ich in ihr keine Flockenbildung.

Dem Schüttelapparat möchte ich gegenüber dem Schütteln mit der Hand unbedingt den Vorzug geben, da die Resultate der vergleichenden Untersuchungen, die ich diesbezüglich anstellte, oftmals eine Inkongruenz aufwiesen, insofern z. B. Sera, die nach dem Schütteln mit der Hand negativ waren, bei Benützung des Schüttelapparates sich als positiv erwiesen. Der Schüttelapparat dürfte also nicht vermißt werden.

An dem Brutschrankaufenthalt von $^1/_2$, doch höchstens 1 Std. ist strikt festzuhalten.

Man läuft nämlich Gefahr, unspezifische Flockung zu erhalten, wenn man den Brutschrankaufenthalt verlängert oder wenn man die Ablesung bei Zimmertemperatur nach mehreren Stunden macht.

Vom Ablesen der Resultate nach 10 Min. langem Schütteln — sei es, daß dieses mit dem Apparate oder mit der Hand geschieht — stand ich im Laufe meiner Untersuchungen vollständig ab, da die Positivität

zu dieser Zeit oft noch nicht zu konstatieren ist, sondern erst später nach dem Brutschrankaufenthalte.

Nur stark positive Sera sind schon nach 10 Min. als solche endgültig zu diagnostizieren.

Die Ablesung der Resultate, resp. die Konstatierung des Auftretens oder Fehlens der Flockenbildung stößt auf keine Schwierigkeiten. Nur das Ablesen mit dem Agglutinoskop erheischt einige Uebung und Vorsicht in Fällen, wo das freie Auge oder die gewöhnliche Lupe die Entscheidung nicht bringen kann. Man sieht hier nämlich oftmals einen sehr minimalen, überaus fein-griesigen Niederschlag, der manchesmal erst beim Hin- und Herbewegen der Eprouvette im Agglutinoskop wahrnehmbar ist. Meine diesbezüglichen, im Laufe der Untersuchungen gesammelten Erfahrungen führten mich dahin, solche Fälle nicht als „unbestimmte“, sondern stets als negative zu bezeichnen.

Im Anschluß daran möchte ich den auffallenden Befund von E. Pieper erwähnen, der in allen Sera stets eine ganz feine gleichmäßige Flockung sah, die zwar leicht von der positiven zu unterscheiden war, aber die Erkennung zweifelhafter Fälle erschwerte.

Soweit mir die Fachliteratur zur Verfügung steht, konnte ich bisher vier Publikationen über die neue Luesreaktion finden, und zwar von E. Heyer, Severin Amend, A. Koppel und E. Pieper.

Mit Ausnahme von Amend, der die Reaktion vor allem der MTR. für nicht ebenbürtig und für die Praxis für noch nicht reif hält, urteilen die übrigen Nachuntersucher über dieselbe günstig. Heyer bekam höchst selten unspezifische Resultate, lobt ihre sehr leichte Ausführbarkeit und meint, daß die Reaktion den Bedürfnissen der Praxis am nächsten zu kommen scheint. Nach Koppel leistet die Reaktion im großen und ganzen ebensoviel, wie die zur Kontrolle herangezogenen anderen Flockungsreaktionen. Pieper stellt ihre Ergebnisse mit denen der anderen erprobten Flockungsreaktionen gleich.

Die von mir untersuchten 1000 Sera stammten größtenteils aus den verschiedenen Abteilungen des St. Stephanspitales, so daß die überaus wichtige klinische Kontrolle sehr leicht möglich war, und nur in der Minderzahl von ambulanten Kranken. Die Ergebnisse der S.K.-Reaktion waren, gegenübergestellt denen der WaR. folgende:

WaR. und S.K.: positiv	327	32,7 Proz.	91,7 Proz.
WaR. und S.K.: negativ	590	59,0 „	
WaR. positiv S.K. negativ	36	3,6 „	8,3 „
WaR. negativ S.K. positiv	47	4,7 „	

Die beiden Reaktionen stimmten also in 91,7 Proz. überein, während in 8,3 Proz. eine Inkongruenz zu konstatieren war. Dieselbe bezog sich auf folgende Fälle:

Lues	WaR. + S.K. —	WaR. — S.K. +
latens	12	13
recens	4	3
recidiva	3	3
tertiana	3	2
Tabes	2	2
	24	23

Keine Lues	WaR. + S.K. —	WaR. — S.K. +
Diagn.?	2	2
Vit. cord.	1	1
Appendic.	1	1
Ulc. molle	2	1
Gonorrhöe	1	1
Nephrolith.	—	1
Carc. uteri	—	1
Laugenvergiftung	—	1
Tuberkulose	—	11
	7	20

Lues?	WaR. + S.K. —	WaR. — S.K. +
Tum. hepat.	1	—
Neurasth.	2	1
Gonorrhöe	2	—
Ulc. cruris	—	1
Perimetrit.	—	1
Tuberkulose	—	1
	5	4

Wie also aus der Tabelle ersichtlich, war in sicher luetischen Fällen der Prozentsatz der Fehldiagnosen bei beiden Reaktionen fast ganz derselbe. Auffallend war jedoch die hohe Unspezifizität der Reaktion bei Tuberkulose, die sich durchweg auf fiebernde Kranke im II. und III. Stadium der Krankheit bezog.

Im Anschluß daran möchte ich erwähnen, daß bei den vergleichenden Untersuchungen, die im Institut seinerzeit mit der WaR., S.-G. und MTR. angestellt wurden, und über die B. Vas das Sammelreferat an die hygienische Sektion des Völkerbundes in Genf erstattete, gleichfalls ein hoher Prozentsatz (70 Proz.) unspezifischer Reaktion mit S.-G. bei Tuberkulotikern im II. und III. Stadium konstatiert werden konnte. Im Gegensatz zu diesen unseren Beobachtungen stehen die von E. Rüscher, der eine nennenswerte Beeinträchtigung der S.-GR. bei Tuberkulose nicht beobachtete.

Auf die theoretische Erklärung dieser Frage möchte ich hier nicht eingehen. H. Sachs und A. Klopstock haben sich mit dieser Frage eingehend beschäftigt und auf die störende Wirkung der erhöhten Labilität der Bluteiweißkörper hingewiesen, die dabei eine Rolle spielen dürfte.

Vom praktischen Standpunkt ist es jedoch wichtig zu wissen, daß man bei Tuberkulose, und auch überall dort, wo eine starke Labilitätssteigerung vorzukommen pflegt (z. B. bei schweren Infektionskrankheiten, Karzinom etc.) mit dem unspezifischen Ausfall der Flockungsreaktion rechnen, also bei der Bewertung des Ergebnisses derselben eine gewisse Vorsicht walten lassen muß.

Endlich sei noch eines Falles erwähnt, bei dem nach einer provokatorischen Salvarsaninjektion die S.-K.-Reaktion schon nach 12 Std. positiv wurde, während die WaR. auch nach 24 Std. negativ blieb. Leider war es mir nicht möglich, den Fall weiter zu beobachten.

Meine Untersuchungen erlauben also folgende Schlüsse:

Die neue Sachs-Klopstocksche Luesreaktion stimmt in fast 92 Proz. mit der WaR. überein. Die Reaktion ist sehr leicht und einfach durchzuführen und besitzt den hohen Vorteil, daß sie schnell ablesbar schon nach einer Stunde ein endgültiges Resultat ergibt.

Bei sog. labilen Sera, und zwar in erster Linie bei solchen von fiebernden Tuberkulotikern, muß man mit der Möglichkeit unspezifischer Reaktion rechnen.

Literatur.

Sachs, H., u. Klopstock, A., Verhandl. d. mikrobiol. Gesellsch. in Göttingen; Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 93. Beiheft. — Dies., Klin. Woch. 1924. Nr. 30 und 40. 1925. Nr. 12. — Dies., Dtsch. med. Woch. 1923. Nr. 41. — Rüscher, C., ebendas. 1923. Nr. 9. — Koppell, A., Klin. Woch. 1925. Nr. 11. — Amend, Severin, ebendas. 1924. Nr. 51. — Pieper, E., ebendas. 1925. Nr. 15. — Vas, B., Vergleich. Untersuchungen mit verschiedenen Luesreaktionen. (Orvosi Hetilap. 1924. Nr. 32.) — Heyer, E., Klin. Woch. 1924. Nr. 46.

Ein Fall von Hefelokalisation in den Halslymphknoten (Blastomykose).

Von Dr. **Manuel Beatti,**
Ex-Professor und ex-Direktor des Nationalen Irrenkrankenspitals von Buenos Aires.

Mit 2 Abbildungen im Text.

Man hat Fälle von Lokalisation der Hefe in den Lymphknoten veröffentlicht, und nach der Literatur, die ich zur Verfügung haben konnte, hat Haberfeld[1]) Fälle von Hefelokalisation mit Fieber beschrieben, die 6 Monate dauerten und mit Beteiligung der Unterkieferlymphknoten verliefen. Er nannte den Prozeß Lymphdrüsengranulom parasitären Ursprungs (Blastomykose).

1918 hatte ich Gelegenheit, einen Kranken aus der Privatpraxis des Herrn Dr. J. M. Escalier zu untersuchen, der eine Lokalisation von Hefe in den Lymphknoten hatte, aber, obschon seine Symptomatologie ungefähr die von Haberfeld angegebene war, waren die Mikroben von abweichendem Aussehen und die Krankheit verlief akut mit Verbreitung der Hefe durch die Blutbahn. Meines Erachtens ist dies der erste beobachtete Fall von solcher Lokalisation in Argentinien.

Geschichte: Mann von 60 Jahren bemerkte 2 Monate vor seinem Eintritt ins Privatsanatorium von Prof. Dr. Molinari harte Knoten auf der linken Seite des Halses in der Unterkieferwinkelgegend. Schmerzen nicht stark, Temperatur nicht über 38,5⁰.

Als ich ihn sah, waren alle Lymphknoten der linken Seite des Halses vergrößert und das Unterhautgewebe ödematös. Die Lymphknoten vergrößerten sich schnell. Eine gute Untersuchung des Rachens war nicht möglich. Bemerkt wurden deutliche Anzeichen mediastinaler venöser Kompression. Die Röntgenuntersuchung zeigte einen Schatten der ganzen Gegend, aber man konnte den Prozeß nicht lokalisieren. Milz war etwas vergrößert. Das Halsödem breitete sich aus, reichte bis zum Thorax und linken Arm; Atemnot und keuchhustenartige Anfälle kamen hinzu; das Herz wurde schwach und der Kranke starb etwa 2 Wochen nach seinem Eintritt ins Sanatorium und wenige Tage nach meiner Untersuchung.

Ich untersuchte das Blut. Es bestand Leukozytose. Im Strichpräparate von Material, das ich von den Lymphknoten entnahm und das wie Eiter mit Blut aussah, sah ich ein Granulationsgewebe, das aus polymorphkernigen Leukozyten, nekrotischem Gewebe, Riesenzellen und Hefen bestand. Ich machte Blutkulturen und es entwickelten sich in Zuckerbouillon Kolonien, die am Boden der Erlenmeyerschen Kolben lagen. An der Oberfläche dieser Kolonien fanden sich schwarz pigmentierte Punkte. Auf Kartoffeln und hauptsächlich im Sabouraud-Nährboden (Strichkultur) konnte ich ein üppiges Wachstum der Kolonien, die zuerst weiß, dick und fadenziehend waren, aber sehr schnell schwarz wie Kohle wurden, beobachten. In dem letztgenannten Nähr-

1) San Paulo 1909 in Bulletin de l'Institut Pasteur. Klin. Woch. 1922.

boden waren die einzelnen Kolonien anfänglich rund und weiß, später aber wuchsen Fäden radiär auf den Nährböden und andere in größerer Menge tief hindurch; die ersteren wurden zuerst schwarz und zuletzt nahm die Kolonie selbst diese Farbe an. Im Gegensatz dazu blieben die tiefen Fäden farblos und sahen wie ein weißer Hof um die Kolonie herum aus (Abbildung I). Kartoffeln wurden sehr schnell durchwachsen, der Sabouraud-Nährboden auch, aber langsam. In glyzerinierten Kartoffeln hatten die Kolonien sehr wenig Pigment und in Agar

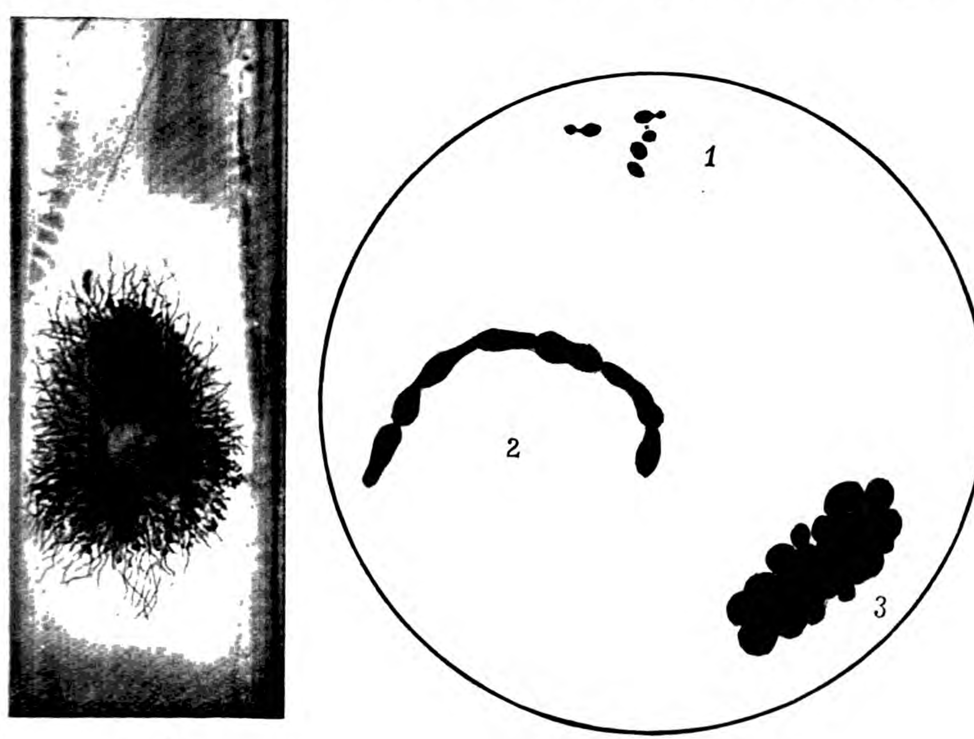


Fig. 1. Fig. II.

Fig. I. 2fache Vergrößerung einer Kolonie: Sabouraud-Nährboden. Innerer Teil hell, weil noch nicht ganz pigmentiert. Um die Kolonie herum helleren Hof.

Fig. II. 1. Aussehen der Hefekolonien selbst. Okular komp. 2, Obj. 2 mm Zeiß.

Fig. II, 2. Darstellung eines dicken, durchwachsenden Fadens. Okular komp. 6, Obj. 2 mm Zeiß.

Fig. II, 3. Anordnung eines dünnen, pigmentierten Fadens von der Oberfläche der Kultur. Okular komp. 6, Obj. 2 mm Zeiß. 1 und 2 waren gefärbte Präparate, 3 ungefärbt.

und Agarascites waren sie weiß und wuchsen langsam. — Bei 37° war das Wachstum üppig. Die Hefen der Kolonie selbst waren verschieden groß, oval oder rundlich und vermehrten sich durch Sprosse (Abbildung II, 1). Sie hatten einen Kern und Vakuolen; aber keine Sporen. Bezüglich der Gärung habe ich nur Dextrose versucht und gefunden, daß sie bis zur Gasbildung vergoren wurde. Die tiefen Fäden, die sich nicht verzweigten und von ungleichmäßiger Dicke waren, setzten sich zusammen aus Kettenbildungen großer langgestreckter,

ovaler, keulenförmiger und geschwollener Zellen (Abbildung II, 2). Die pigmentierten Fäden, die sich oberflächlich entwickelten und die auch nicht verzweigt waren, waren im allgemeinen sehr dick und bestanden aus sehr großen, hauptsächlich runden, reihenförmig angeordneten Hefen (Abbildung II, 3). Die Hefen waren pathogen für Mäuse und Ratten.

Die Eintrittspforte der Hefe waren wahrscheinlich die Tonsillen. — Als der Kranke zu uns kam, war es schon zu spät, und ich glaube, daß schon Septikämie vorhanden war.

Filaria spirovoluta, ein neuer Nematode aus dem Bindegewebe des Pferdes.

Von **H. J. Smit** (Buitenzorg, Java) und **J. E. W. Ihle** (Utrecht).

Mit 1 Abbildung im Text.

Einer von uns (Smit) fand in einem Pferd, welches in der Tierarzneischule in Buitenzorg (Java) für die anatomischen Uebungen getötet war, einen Nematoden, welcher noch nicht beschrieben zu sein scheint. Die Untersuchung fand in Buitenzorg statt, und da das nach Holland geschickte Material für eine nähere Untersuchung nicht mehr geeignet war, konnte der Nematode nur von einem von uns (Smit) studiert werden.

Die Würmer wurden im lockeren Bindegewebe unter dem M. pectoralis profundus aufgefunden. Sie liegen hier zum Teil aufgerollt in einer rückläufigen Spirale (Fig. A). Die Windungen sind aber nicht immer so deutlich spiralig angeordnet wie bei dem abgebildeten Exemplare.

Es war ziemlich leicht, die lebenden Tiere aus dem Bindegewebe herauszupräparieren. Drei vollständige weibliche Exemplare wurden in dieser Weise gesammelt. ♂♂ wurden nicht gefunden. Nach Fixation in Alkohol war es nicht mehr möglich, die Tiere aus dem Bindegewebe herauszupräparieren.

Der Parasit verursacht keine pathologisch-anatomischen Veränderungen; das Bindegewebe war vollkommen normal. Ebensowenig werden Knötchen gebildet.

Die Länge der 3 gesammelten Exemplare beträgt resp. 95, 125 und 132 mm; die maximale Dicke 272 μ. Das Vorderende ist 95 μ breit und abgerundet (Fig. B). Gleich hinter dem Vorderende wird der Körper etwas dicker und behält diese Dicke bis in der Nähe des Hinterendes. Letzteres (Fig. F) ist hinter dem After leicht gekrümmt und wird allmählich dünner, um stumpf-konisch zu enden. Dieses stumpfe Ende trägt 5 Höcker, und zwar einen größeren ventromedianen, 2 laterale und 2 medio-dorsale Höcker (Fig. E, E').

Die runde Mundöffnung scheint von 4 kleinen submedianen Papillen umgeben zu sein. Unter der Oberfläche liegt hier eine körnige Masse.

Der Mund führt in den engen Oesophagus, welcher sich im Vorderende des Körpers spindelförmig erweitert, um sich dann als ein enges Rohr bis zum Mitteldarm fortzusetzen (Fig. C). Dieser ist weiter als

der Oesophagus und verläuft in steilen Windungen durch den Körper (Fig. D). Der Anus liegt 320 μ vor dem Hinterende des Tieres (Fig. F).

Der Porus excretorius liegt 385 μ hinter dem Vorderende auf einer sehr schwachen Erhebung an der Ventralseite des Körpers. Die Vulva

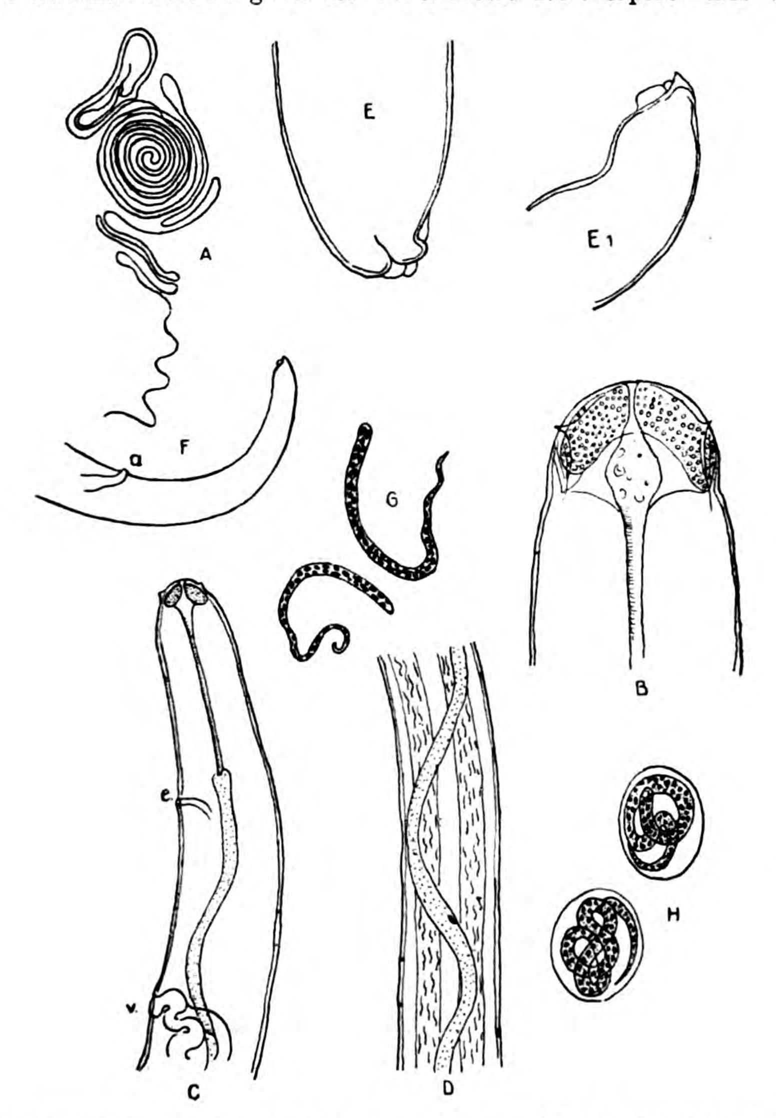


Fig. 1 Filaria spirovoluta n. sp. ♀. A Das Tier in natürlicher Lage im Bindegewebe; B und C Vorderende. *p. e.* Porus excretorius, *v* Vulva. Der Oesophagus ist vielleicht nicht ganz richtig dargestellt worden; D Teil des Körpers mit Uteri (mit ausgeschlüpften Embryonen) und Mitteldarm; E, E', F Hinterende. *a* Anus; G ausgeschlüpfte Embryonen; H Eier mit wurmförmigem Embryo.

liegt 880—1130 μ hinter dem Vorderende. Sie führt in eine kurze Vagina, in welche die beiden langen Uteri münden, welche fast den

ganzen Körper ausfüllen. In den Uteri findet man sowohl ausgeschlüpfte Embryonen als solche, welche sich noch in der Eischale befinden, daneben auch sich furchende Eier. Dieser Nematode ist also vivipar.

Die Embryonen sind in der Eischale leicht gekrümmt (Fig. H). Die ausgeschlüpften Embryonen (Fig. G) haben ein stumpfes, abgerundetes Vorderende; nach hinten werden sie allmählich dünner, um in eine Spitze zu enden. Ihre Länge beträgt 160—190 μ, ihre Dicke 3,3 μ.

Von dem Pferde, in welchem der Nematode gefunden wurde, wurden Blutpräparate angefertigt. In dem Blute der V. jugularis und dem System der V. portae wurden einige Larven angetroffen. Letztgenannte zirkulieren also in dem venösen Kreislauf. Man darf schließen, daß die Infektion des Pferdes durch den Stich blutsaugender Insekten zustande kommt, wie bei anderen Filarien.

Von den im Bindegewebe des Pferdes aufgefundenen Filarien ist keine mit der beschriebenen Art identisch. Wenn wir von den Onchocerca-Arten absehen, sind es (Railliet, 1915, p. 747, 748), die fast vergessene Filaria cordicola v. Linstow (1905, p. 275), Filaria haemorrhagica Railliet und eine Loa sp.

Obwohl die vorliegende Beschreibung des aufgefundenen Parasiten sehr unvollständig ist, zumal durch das Fehlen von ♂♂ im Material, glauben wir, denselben doch als zu einer neuen Art gehörend betrachten zu dürfen, welche vorläufig im Sammelgenus Filaria O. F. M. verbleiben mag. Verwandtschaft mit der Gattung Acanthocheilonema Cobbold (Railliet, Henry et Langeron, 1912, p. 392) scheint aber nicht ausgeschlossen zu sein. Um die typische spiralige Aufrollung des Tieres im Namen zum Ausdruck zu bringen, nennen wir die neue Art Filaria spirovoluta.

Literatur.

Linstow, v., Neue Helminthen. (Arch. f. Naturgesch. Jahrg. 71. Bd. 1. 1905.) — Railliet, A., Henry, A., et Langeron, M., Le genre Acanthocheilonema Cobbold, et les Filaires péritonéales des Carnivores. (Bull. Soc. path. exot. T. 5. 1912.) — Railliet, A., L'emploi des médicaments dans le traitement des maladies causées par des Nematodes. (10. Internat. Veterinary congress. 1914. Vol. 3. 1915.)

Nachdruck verboten.

Rieckenbergs Phänomen und dessen Anwendung in bezug auf Immunitätsvorgänge.

[Aus dem Wissenschaftlichen Institut für mikrobiologische Untersuchungen an der Moskauer Medizinischen Hochschule (II. Staats-Universität) und aus dem Laboratorium des Reichs-Anilintrustes (Direktor: Prof. I. L. Kritschewsky).]

Von Dr. **A. M. Brussin** und **W. K. Beletzky**,

Das Wesen des Rieckenbergschen Phänomens besteht im Ankleben der Blutplättchen an Trypanosomen. Dieser Vorgang tritt ein,

wenn Blut einer mit Trypanosomen infizierten Maus mit dem einer anderen Maus, die von derselben Trypanosomeninfektion geheilt ist, in Zitratbouillon gemischt wird. Bei Erforschung dieses Phänomens ist Rieckenberg zu folgenden Schlußfolgerungen gekommen:

1) Im Blute mit experimenteller Trypanosomiasis infizierter und danach geheilter oder chronisch infizierter Versuchstiere lassen sich Reaktionskörper nachweisen, die sich darin kundtun, daß Trypanosomen einer Ratte oder Maus in einer Zitratblutaufschwemmung dieser Tiere mit Blutplättchen beladen werden. — 2) Diese Reaktion ist streng spezifisch; sie tritt nur dann ein, wenn ein homologer Tryponosomenstamm zur Reaktion benutzt wird. — 3) Durch diese Reaktion kann ein Ausgangsstamm von einem Rezidivstamm unterschieden werden. — 4) Die Reaktion tritt in allen denjenigen Fällen auf, in denen eine Immunität gegen Reinfektion bestehen würde[1]).

Da das von Rieckenberg entdeckte Phänomen zur Erläuterung einer ganzen Reihe wichtiger Probleme führen könnte, machte uns Prof. Kritschewsky den Vorschlag, die Beziehungen der in unserem Institut befindlichen Arten und Stämme von Trypanosomen zu dem oben erwähnten Phänomen zu verfolgen.

Es standen uns bei unseren Arbeiten folgende Arten und Stämme von Trypanosomen zur Verfügung: Tr. Brucei „a“ und 2 Stämme Tr. equiperdum[2]) 1) ein gewöhnlicher Ausgansstamm und 2) ein salvarsanfester[3]) Stamm.

In der Absicht, die Blutmischung bequemer und gleichartiger zu bekommen, machten wir in letzterer Zeit eine Abweichung von der Rieckenbergschen Technik, indem wir die Aufschwemmungen nicht auf einem Objektträger, sondern in besonders angeordneten spitzen Probierröhrchen (eine am Ende zugeschmolzene Pasteursche Pipette) bereiteten. Dank dieser Technik ergab sich die Möglichkeit, die Reaktion im Brutschrank anzustellen, so daß dieselbe sich viel schneller einstellte und viel schärfer ausfiel. Unsere Technik gestaltete sich folgendermaßen: Mittels einer Pasteurpipette nehmen wir etwa 3 Tropfen alkalischer Zitratbouillon und führen sie in ein spitzendiges Probierröhrchen ein. Darauf werden 2 Tropfen Blut einer geheilten Maus zugesetzt, das Ganze wird schnell und sorgfältig durchgemischt und unmittelbar danach ein Tropfen trypanosomenhaltigen Blutes zugefügt und wiederum sorgfältig vermischt, worauf die ganze Mischung auf 15 Min. in den Brutschrank bei 37° gestellt wird. Mit einer reinen Pipette wird jetzt ein Tropfen der oben erwähnten Mischung auf einen Objektträger gebracht, mit einem Deckglase bedeckt und bei etwas verdunkeltem Gesichtsfelde mittels eines starken Trockensystems untersucht. Das Bild gestaltet sich hierbei so deutlich, daß ein Dunkelfeld bei der Untersuchung überflüssig wird. Am leichtesten und bequemsten ist das Resultat der Reaktion dann zu bewerten, wenn die Anzahl der Trypanosomen nicht zu hoch ist,

1) Dieser Satz ist von Rieckenberg experimentell nicht bewiesen worden.

2) Weiterhin werden wir in unserer Arbeit den Ausgangsstamm Tr. equiperdum mit dem Buchstaben „I“, den salvarsanfesten Stamm dagegen mit dem Buchstaben „U“ bezeichnen.

3) Dieser Stamm wurde derart erhalten, daß der Ausgangsstamm ungefähr vor 1 Jahre auf eine Maus übertragen und mittels Injektion steigender Salvarsandosen im Verlaufe der ersten Monate dementsprechend gegen die gewöhnlichen therapeutischen Dosen von Salvarsan unempfindlich gemacht worden war. Der Stamm Tr. equiperdum „I“ wurde in Meerschweinchen umgezüchtet und erst bei Beginn unserer Untersuchungen auf Mäuse übertragen.

nämlich bis 10 Exemplare im Gesichtsfelde. In solchen Fällen sieht man gewöhnlich, wie sich Häufchen von Blutplättchen an dem Geißelende der Trypanosomen anheften. Diese letzteren suchen sich mittels energischer Bewegungen von den Blutplättchen frei zu machen, was ihnen jedoch nicht gelingt. Manchmal ist das Trypanosoma in so hohem Grade mit Blutplättchen bedeckt, daß es ganz unsichtbar wird und nur die charakteristische Bewegung des ganzen Haufens die Anwesenheit eines Trypanosoma bestätigt.

Oefters tritt bei einer kleinen Anzahl von Trypanosomen in diesen Aufschwemmungen eine Agglomeration auf, und dann sehen wir, daß das Agglomerat der Trypanosomen völlig mit Blutplättchen beladen ist. Wird zu der Reaktion eine große Menge Trypanosomen genommen, so stellt sich zwar in der Regel eine Agglomeration ein, doch verliert das Phänomen bedeutend an Anschaulichkeit, besonders bei schwach ausgeprägter Reaktion. Außerdem beobachteten wir alsdann fast immer bei der Arbeit mit unseren Stämmen, daß stets ein gewisses Prozentsatz derselben frei von Blutplättchen blieb.

Ein völliges Fehlen mit Blutplättchen beladener Trypanosomen bei gleichzeitiger Anwesenheit einzelner freier Blutplättchen betrachten wir als eine negative Reaktion. Waren die Trypanosomen frei von Blutplättchen und hatten letztere sich in Häufchen gesammelt (wenn zu wenig Zitrat genommen oder schlecht gemischt war), so wurde die Reaktion wiederholt.

Was das Resultat unserer Arbeit im großen und ganzen anbetrifft, so haben unsere Experimente die von Rieckenberg beobachteten Vorgänge vollständig bestätigt. Außerdem haben wir neue Tatsachen festgestellt, die auf eine außerordentlich feine Spezifität des Rieckenbergschen Phänomens deuten und die Möglichkeit geben, dasselbe bei der Untersuchung von Immunitätsfragen anzuwenden..

Das Rieckenbergsche Phänomen ist zweifellos eine erworbene Immunitätsreaktion. Das Blut normaler Mäuse gibt bei Mischung mit Trypanosomen niemals auch nur eine Andeutung einer positiven Reaktion. Nur der Untergang von Trypanosomen im Körper eines Tieres, der durch eine spezifische Behandlung oder durch im Körper selbst entstandener Schutzanordnungen bedingt sein kann, vermag gewisse Reagine im Blute zum Vorschein zu rufen, die das Beladen der entsprechenden Trypanosomen mit Blutplättchen verursachen. Die nachfolgenden, verkürzt wiedergegebenen Tabellen, die unseren Protokollen entnommen sind, lassen die Spezifität des Rieckenbergschen Phänomens mit genügender Deutlichkeit erkennen.

Werden Trypanosomen einer gewissen Art mit Blut einer Maus, die von Trypanosomen einer anderen Art geheilt worden ist, miteinander gemischt, fällt die Reaktion immer negativ aus: Tr. Brucei wird von Blutplättchen nicht beladen, falls für die Reaktion das Blut einer Maus, die von Trypanosoma equiperdum geheilt worden ist, genommen wird, und umgekehrt (s. Tab. Nr. I S. 35).

Werden aber auch Trypanosomen derselben Art zur Reaktion genommen, so ist damit noch nicht gesagt, daß die Reaktion positiv ausfallen wird. Rezidivtrypanosomen, die nach einer noch so kurzen Remission im Blute erscheinen, verlieren die Eigenschaft, eine positive Reaktion mit dem Blute einer von der Ausgangsrasse geheilten Maus zu geben. Ebenso werden auch Trypanosomen der Ausgangsrasse nicht mit Blutplättchen beladen, falls sie mit dem Blute einer Maus, die mit

Tabelle I[1]) 30. 1. 1923.

Nr. der Mäuse, die die Trypanosomen lieferten	Nummer geheilter Mäuse		Normale Maus
	Nr. 19, kuriert am 17. 1. von Tr. equiperdum	Nr. 3, kuriert am 25. 1. von Tr. Brucei	
Nr. 21, Maus infiziert mit Tr. equiperdum	+ + + + +	— — — — —	— — — — —
Nr. 5, Maus infiziert mit Tr. Brucei	— — — — —	+ + + + +	— — — — —

einer Rezidivrasse infiziert und von derselben geheilt worden ist, gemischt werden.

Nur wenn zur Reaktion Trypanosomen einer gewissen Rasse und das Blut einer Maus, die von derselben Trypanosomenrasse geheilt ist, genommen werden, wird das Rieckenbergsche Phänomen positiv (s. Tab. Nr. II und III).

Tabelle II.

Datum des Experimenttages	Nr. der Mäuse, die die Trypanosomen lieferten	Trypanosomenrasse	Nr. der Mäuse, die von der Ausgangsrasse kuriert worden sind	Versuchsausfall
10. 5	Ia	I. Rezidiv	Nr. 4	— — — — —
„	Nr. 6	Ausgangsrasse	„ 4	+ + + + +
21. 5.	„ 6'	I. Rezidiv	„ 8	— — — — —
„	„ 10	Ausgangsrasse	„ 8	+ + + + +
3. 6.	„ 9'	I. Rezidiv	„ 11	— — — — —
„	C.	Ausgangsrasse in Meerschweinchen gezüchtet	„ 11	— — — — —
„	Nr. 14	Ausgangsrasse	„ 11	+ + + + +

Tabelle III (5. 5. 23).

Nummer der Mäuse, die die Trypanosomen lieferten	Nummer der kurierten Mäuse	
	Nr. 1. Trypanosoma Brucei Ausgangsrasse, kuriert den 29. 4.	Nr. A. Trypanosoma Brucei, Rezidivrasse
Nr. 4. Tr. Brucei, Ausgangsrasse, von der die Maus Nr. 1 geheilt worden ist	+ + + + +	— — — — —
Nr. 13. Tr. Brucei, Rezidivrasse, von der die Maus Nr. A geheilt worden ist	— — — — —	+ + + + +

1) Bezeichnungen:
+ + + + + bedeutet die vollständige Abwesenheit von freien Trypanosomen,
+ + + + — „ „ Anwesenheit einzelner Exemplare von blutplättchenfreien Trypanosomen,
+ + + — — „ „ Hälfte der Trypanosomen ist mit Blutplättchen beladen,
+ + — — — „ weniger als die Hälfte ist mit Blutplättchen beladen,
+ — — — — „ die Anwesenheit vereinzelter mit Blutplättchen beladener Trypanosomen,
— — — — — „ „ vollständige Abwesenheit von mit Blutplättchen beladener Trypanosomen.

Aus der Tabelle III ist folgendes Resultat ersichtlich: Rezidivtrypanosomen verlieren die Eigenschaft, mit Blutplättchen beladen zu werden, falls sie mit dem Blute einer Maus gemischt werden, die von der Ausgangsrasse geheilt worden ist; sie werden jedoch energisch mit denselben beladen, wenn sie mit dem Blut einer Maus in Berührung kommen, die mit einer entsprechenden Rezidivrasse infiziert und von derselben geheilt worden ist.

Rieckenbergs Phänomen kann mit Erfolg zur Differenzierung verschiedener Rezidivrassen angewandt werden. Wir haben Tr. Brucei durch eine Reihe von Mäusen geschickt, wobei die letzten mit ungenügenden Salvarsandosen behandelt wurden, und erhielten schließlich während des 9. Rezidivs eine Trypanosomenrasse, die in bezug auf ihr Verhalten zur RR.[1]) einen wesentlichen Unterschied von der vorhergehenden Rezidivrasse des 8. Rezidivs zeigte. Ebenfalls ließ sich eine auf solchem Wege nach 13fachem Rezidivieren erhaltene Rasse des Tr. equiperdum von der vorhergehenden, also 12. Rezidivrasse, mittels RR. unterscheiden. Diese Vorgänge deuten auf eine äußerst feine Spezifität der RR. und weisen darauf hin, daß den Trypanosomen in hohem Maße die Fähigkeit zukommt, sich zu verändern (s. Tab. IV).

Tabelle IV.

Nummer der Maus, die die Trypanosomen lieferten	Nummer der kurierten Mäuse		Nummer der Maus, die die Trypanosomen lieferten	Nummer der kurierten Maus
	Nr. b, kuriert von der Rasse, die im Result. des 8. Rezidivs erschienen ist	Nr. d, kuriert von der Rasse, die im Result. des 9. Rezidivs erschienen ist		Nr. 6, kuriert von der Rasse, die im Resultat des 12. Rezidivs erschienen ist
Nr. a, die von der Maus Nr. b infiziert worden ist, bevor das 8. Rezidiv kuriert worden ist	+ + + + +	— — — — —	Nr. 7, die von der Maus Nr. 6 infiziert worden ist, bevor das 12. Rezidiv kuriert worden ist	+ + + + +
Nr. c, die von der Maus Nr. d infiziert worden ist, bevor das 9. Rezidiv kuriert worden ist	— — — — —	+ + + + +	Nr. 7a, die von der Maus Nr. 7 infiziert worden ist, bevor das 13. Rezidiv kuriert worden ist	— — — — —

Nunmehr muß naturgemäß die Frage gestellt werden, ob die RR. positiv ausfällt, wenn wir eine gewisse Rezidivtrypanosomenrasse mit dem Blut einer Maus mischen, die von einer solchen Trypanosomenrasse kuriert ist und die bis zur letzten Kur dieselbe Anzahl von Rezidiven durchgemacht hat, wie die zum Experiment genommene Rezidivrasse. In der Tat fällt bei solcher Versuchsanordnung die RR. in einer ganzen Reihe von Fällen positiv aus. Der negative Ausfall der Reaktion bei manchen Mäusen muß auf Rechnung eines übersehenen Rezidivs gesetzt werden [2]).

1) RR. = Rieckenbergsche Reaktion.

2) Beim Experimentieren mit festen Trypanosomenrassen kann man oft beobachten, wie die Trypanosomen, nachdem sie im Blute der Maus spärlich erschienen sind, sofort aus demselben verschwinden, um nach einigen Tagen wieder zum Vorschein zu kommen. Bei solchen Verhältnissen kann ein Rezidiv mit Leichtigkeit übersehen werden.

Läßt sich also auf Grund eines negativen Ausfalls der RR. noch kein bestimmter Schluß über die Angehörigkeit der geprüften Trypanosomenrasse zu einem gewissen Rezidiv ziehen, so deutet der positive Ausfall der RR. unfehlbar auf ein Uebereinstimmen der Zahl der Rezidive bei den Versuchsmäusen. Folgendes Beispiel erläutert das oben Gesagte: Maus Nr. 22 und Nr. 31 sind mit derselben Rasse des Tr. Brucei zu verschiedener Zeit infiziert worden, beide Mäuse wurden mit Salvarsandosen, die für eine Sterilisatio magna ungenügend sind, behandelt. Maus Nr. 22 gab am 14. Tage nach beendeter Salvarsanbehandlung das erste Rezidiv und wurde auf dem Kulminationspunkte der Infektion einer Salvarsanbehandlung unterworfen. Bei Maus Nr. 31 stellte sich das Rezidiv erst am 18. Tage nach beendeter Salvarsanbehandlung ein. Die RR. fällt hierbei — Rezidivtrypanosomenrasse von der Maus Nr. 31 mit dem Blut der vom Rezidiv geheilten Maus Nr. 22 — folgendermaßen aus + + + — —. Zur selben Zeit erhalten wir eine negative RR., wenn (Kontrollversuch) dieselbe Trypanosomenrasse von der Maus Nr. 31 mit dem Blut der Maus Nr. 37, die von der Ausgangstrypanosomenrasse (von dieser. wurden anfangs Maus Nr. 31 und Nr. 22 infiziert) geheilt worden ist, gemischt wird.

Das 2. Kontrollexperiment besteht darin, daß zum Gemisch das Blut der Maus Nr. 16, die mit Trypanosomen des 2. Rezidivs infiziert und von ihm geheilt worden ist, genommen wird, es zeigt ebenfalls ein negatives Resultat.

Die Reaktionskörper, die das positive Resultat des Rieckenbergschen Phänomens bedingen, erscheinen im Blute des Versuchstieres erst nach Verlauf einer bestimmten Zeit nach dem Verschwinden der Trypanosomen aus dem Blute des Tieres. Rieckenberg entdeckte ihre Anwesenheit im Blute erst 3 oder 4 Tage nachdem die Trypanosomen aus dem Blute des Versuchstieres verschwunden waren. Bei unseren Experimenten bekamen wir immer eine positive RR. mit Mäuseblut, welches am 3. Tage nach der Kur entnommen war; doch gelang es uns öfters, das Auftreten der Reagine bereits nach 24 Std. im Blute der kurierten Mäuse nachzuweisen (s. Tab. V). Dieses frühzeitige Erscheinen der Reagine betrachten wir als individuelle Eigenschaften der Versuchstiere, da keine andere Erklärung zur Hand liegt.

Tabelle V.
RR. mit Mäuseblut, das nach Verlauf von 24 Std. nach der Behandlung entnommen war.

Trypanosomenart	Nummer der Mäuse, die die Tryp. zu RR. lieferten	Nummer der kurierten Mäuse	Tag der Behandlung	Datum des Versuchstages	Ausfall der RR.
Tr. Brucei	Nr. 5	Nr. 4	6. 5.	7. 5.	+ + — — —
dgl.	„ 10	„ 9	20. 5.	21. 5.	+ + + + +
Tr. equiperdum	„ 71	„ 70	5. 5.	6. 5.	+ + + + +

Die Blutplättchen der geheilten Mäuse behalten ihre Fähigkeit, sich an die Trypanosomen anzukleben, während einer langen Zeitdauer. So z. B. verschwindet diese Fähigkeit bei Mäusen, die von Tr. equiperdum Stamm „I“ geheilt worden sind, erst nach Verlauf von $2^1/_2$ bis 3 Monaten.

Aus dem Protokoll „A".

Ausfall der RR. bei Mäusen, die von Tr. equiperdum Stamm „I" mit 0,05 pro 1 g Gewicht einer Salvarsanlösung 1:800 behandelt worden sind, nach Verlauf von verschiedenen Zeitintervallen nach solcher Kur.

Maus Nr. 48. Gewicht 15,0, kuriert bei Trypanosomengehalt 10/1[1]).
Nach Verlauf von 2 Mon., 3 Woch. nach beendeter Kur war RR. +++++
„ „ „ 3 „ 1 „ „ „ „ „ „ Spuren
„ „ „ 4 „ 3 „ „ „ „ „ „ negativ
„ „ „ 5 „ — „ „ „ „ „ „ „

Maus Nr. 49. Gewicht 15,0, kuriert bei Trypanosomengehalt viele/1.
Nach Verlauf von $2^1/_2$ Mon. nach beendeter Kur war RR. +++++
„ „ „ 3 „ „ „ „ „ „ Spuren

Maus Nr. 52. Gewicht 16,0, kuriert bei Trypanosomengehalt viele/1.
Nach Verlauf von 2 Mon. nach beendeter Kur war RR. +++++
„ „ „ 2 „ 3 Woch. nach beendeter Kur war RR. negativ

Maus Nr. 54. Gewicht 13,0, kuriert bei Trypanosomengehalt viele/1.
Nach Verlauf von $1^1/_2$ Mon. nach beendeter Kur war RR. +++++
„ „ „ 2 „ 3 Woch. nach beendeter Kur war RR. negativ
„ „ „ 3 „ 3 „ „ „ „ „ „ „
„ „ „ 4 „ — „ „ „ „ „ „ „

Maus Nr. 62. Gewicht 17,0, kuriert bei Trypanosomengehalt 30/1.
Nach Verlauf von $1^1/_2$ Mon. nach beendeter Kur war RR. +++++
„ „ „ 2 „ 3 Woch. nach beendeter Kur war RR. +++++
Weiterhin wurde diese Maus zu einem anderen Experiment genommen.

Maus Nr. 68. Gewicht 18,0, kuriert bei Trypanosomengehalt 20/1.
Nach Verlauf von 1 Mon. nach beendeter Kur war RR. +++++
„ „ „ 2 „ „ „ „ „ „ +++++
„ „ „ 2 „ 17 Tag. nach beendeter Kur war RR. +++++

Leider können wir nicht mit derselben Bestimmtheit darüber urteilen, wie lange die von Tr. Brucei kurierten Mäuse die Fähigkeit, ein positives Phänomen zu geben, behalten, da früh kurierte Mäuse infolge einer großen Widerstandsfähigkeit unseres Stammes „a" gegen Salvarsan sehr bald Rezidiven unterliegen und zugrunde gehen. Die uns zur Verfügung stehenden Mäuse, die $1—1^1/_2$ Monate zuvor eine Salvarsankur durchgemacht hatten, gaben fortdauernd eine deutlich ausgeprägte positive RR. Unten sind die höchsten Grenzen der Zeiträume angegeben, nach deren Verlauf die RR. bei Mäusen, die mit Tr. Brucei „a" infiziert und mit 0,05 ccm pro 1 g Gewicht mit Salvarsanlösung 1:800 behandelt worden sind, positiv ausfällt (s. Protokoll „B").

Aus dem Protokoll „B".

Maus Nr. 1'. Gewicht 19,0, kuriert bei Trypanosomengehalt 17/1.
Nach Verlauf von 17 Tag. nach beendeter Kur war RR. +++++
„ „ „ 1 Mon. „ „ „ „ „ „ +++++

Maus Nr. 4'. Gewicht 17,0, kuriert bei Trypanosomengehalt 20/1.
Nach Verlauf von 17 Tag. nach beendeter Kur war RR. +++++
„ „ „ 1 Mon. „ „ „ „ „ „ +++++

Maus Nr. 7'. Gewicht 17,0, kuriert bei Trypanosomengehalt 12/1.
Nach Verlauf von 17 Tag. nach beendeter Kur war RR. +++++
„ „ „ 1 Mon. „ „ „ „ „ „ +++++

Maus Nr. 54. Gewicht 20,0, kuriert bei Trypanosomengehalt 4/1.
Nach Verlauf von 1 Mon. 3 Woch. nach beendeter Kur war RR. +++++

Maus Nr. 62. Gewicht 14,0, kuriert bei Trypanosomengehalt viele/1.
Nach Verlauf von 1 Mon. nach beendeter Kur war RR. +++++

---

1) Der Nenner bezeichnet die Anzahl der Trypanosomen, der Zähler die Anzahl der Gesichtsfelder.

Was die Beständigkeit des Rieckenbergschen Phänomens anbetrifft, so erwies es sich, daß die zu unseren Arbeiten verwendeten Arten und Stämme hinsichtlich ihres Vermögens, eine konstante und sich regelmäßig wiederholende RR. zu geben, nicht gleichwertig sind.

Tabelle VIa.

RR. bei Mäusen, die von dem Ausgangsstamm Tr. Brucei „a“ kuriert worden sind nach Verlauf von verschiedener Tagesanzahl in Mischung mit entsprechenden Trypanosomen. (Aus den Protokollen.)

Anzahl der Trypanosom. im Gesichtsfelde am Experimenttage	Experimenttag	Tag der Kur:	27. 5.	31. 5.	
		Nummer der Mäuse, die Trypanosomen lieferten	Nummer der geheilten Mäuse		
			11	12	13[1])
9/10	2. 6.	14	+ + + + —	+ + + + —	+ + + + —
3/1	5. 6.	15	+ + + + +	+ + + + —	+ + + — — Rezidiv eingetreten (Trypanosomenzahl 5/10)
5/1	8. 6.	16	+ + + + +	+ + + + —	+ — — — — Rezidiv (Trypanosomenzahl 16/1)
4/10	10. 6.	17	+ + + + —	.	+ + + — —
viele /1	12. 6.	17	+ + + — —	+ + + — —	+ + + — —
11/10	14. 6.	22	+ + + + +	+ + + + +	+ + + + +
7/10	14. 6.	24	+ + + + +	+ + + + +	+ + + + +
25/1	15. 6.	22	+ + + + +	+ + + + +	+ + + + +
15/1	15. 6.	24	+ + + + +	+ + + + +	+ + + + +
8/1	15. 6.	28	+ + + + +	+ + + + +	+ + + + +

Tabelle VIb.

…panosomen im Gesichtsfeld am Experimenttag	Experimenttag	Tag der Kur:	15. 6.	15. 6.	15. 6.	15. 6.	15. 6.	15. 6.
		Nr. d. Mäuse, die die Tr. Brucei „a“ lieferten	Nummer der geheilten Mäuse					
			19	20	21	23	25	27
—30/1	22. 6.	29	++++—	++++—	++++—	++++—	++++—	++++—
12/1	25. 6.	30	.	+++++	+++++	++++—	.	+++++
ele /1	26. 6.	30	++———	.	.	++———	++++—	.
3/10	27. 6.	31	++———	+++++	++++—	++++—	++++—	++++—
)/10	1. 7.	33	+++++	.	+++++	+++++	+++++	+++++

Aus den angeführten Tabellen Nr. VIa, VIb und VII sehen wir, daß, wie der Stamm „a“ Tr. Brucei, so auch der Stamm „U“ Tr. equiperdum eine ständig und regelmäßig positiv ausfallende RR. geben; blutplättchenfreie Trypanosomen kommen zwar vor, jedoch selten

1) Die Maus Nr. 13 hatte zuerst 0,9 g Salvarsanlösung 1:800 erhalten. 27. 5., d. h. am 12. Tage, wurde sie mit Tr. Brucei von Maus Nr. 11 infiziert; 30. 5.: 5/1, 31. 5.: 6/1, 2. 6.: 1/25, 3. 6.: 0, 5. 6.: 5/10, 7. 6.: 1/1, 8. 6,: 16/1, kuriert mit 0,9 g Salvarsanlösung 1:800, 9. 6.: 0, 14. 6.: 0, 19. 6.: 1/10, 21. 6.: 0, 23. 6.: 1/1, kuriert mit 0,9 g Salvarsanlösung 1:800, 26. 6.: 1/20, 28. 6.: 5/1, kuriert mit 1:800 Salvarsanlösung, 29. 6.: viele/1, 30. 6.: †.

Tabelle VII.

RR. bei Mäusen, die von Tr. equiperdum „U" (salvarsanfeste Rasse) kuriert worden sind, nach Verlauf von verschiedener Tageszahl. Die Mäuse unterlagen einer Kur mit saurer Salvarsanlösung 0,05 pro 1 g Gewicht in Lösung 1 : 100 (hypertoxische Salvarsandosen)[1].

Auszüge aus den Protokollen.

Anzahl der Trypanosomen im Gesichtsfelde am Experimenttage	Experimenttag	Nummern d. Mäuse, die die Trypanosomen lieferten	Tag der Kur: 6. 4. — Nummern der geheilten Mäuse: Nr. 6	10. 4. — Nr. 7
4/1	9. 4.	Nr. 7	+++++	.
30/1	10. 4.	dgl.	+++ — —	.
4/1	14. 4.	Nr. 10	++++ —	.
viele /1	21. 4.	„ 11	++++ —	.
15/1	28. 4.	„ 13	+++++	.
1/2	2. 5.	„ 14	.	+++++
25/1	4. 5.	dgl.	++++ —	+++++
40/1	7. 5.	„	++++ —	.
viele /1	12. 5.	Nr. 15	+++++	+++++
viele /1	16. 5.	„ 17	++++ —	.

und erscheinen meistenteils in den Fällen, wenn im Blute der Maus, die die Trypanosomen lieferte, eine große Anzahl Trypanosomen vorhanden war. Weiterhin werden wir eine Erklärung dieser Erscheinungen geben.

Was den Stamm „I" Tr. equiperdum anbetrifft, so gibt er lange nicht so regelmäßig positive RR., wie es bei den oben genannten Stämmen der Fall ist. Bei diesem Stamme Tr. equiperdum konnten wir in bezug auf sein Verhalten zur RR. folgende Eigentümlichkeiten feststellen:

1) Im Beginn der Infektion sind die Trypanosomen noch einigermaßen (mehr oder weniger) befähigt, mit Blutplättchen aus dem Blute einer Reihe kurierter Mäuse beladen zu werden, verlieren jedoch sehr oft am Höhepunkte der Infektion diese Eigenschaft (s. Tab. VIII).

Tabelle VIII.

Ausfall der RR. am Anfang und am Ende der Infektion.

Experimenttag	Nummern d. Mäuse, die die Trypanosomen lieferten	Anzahl der Trypanosomen im Gesichtsfelde	Nummer der geheilten Mäuse	RR.
2. 5.	Nr. 22	5/1	Nr. 1	+ + + + +
4. 5.	dgl.	10/1	dgl.	+ — — — —
26. 4.	Nr. 20	1/1	„	+ + + + +
28. 4.	dgl.	viele /1	„	— — — — —
26. 5.	Nr. 34	1/1	Nr. 2	+ + + + +
29. 5.	dgl.	viele /1	dgl.	— — — — —
2. 6.	Nr. 33	1/2	„	+ + + + +
4. 6.	dgl.	Mehrheit /1	„	— — — — —

1) Siehe Kritschewsky u. Brussin, Von der Wirkung hypertoxischer Dosen Salvarsan auf salvarsanfeste Trypanosomenrassen in Verbindung mit der Frage von der Pathogenese der Schlafkrankheit und der Parasyphilis (Ztschr. f. Immunitätsforsch. Bd. 39. 1924. H. 3).

2) Sehr oft erhalten die Trypanosomen, bei denen die Eigenschaft des Anhaftens der Blutplättchen am Höhepunkte der Infektion vermißt wird, diese Fähigkeit von neuem, wenn sie auf eine frische Maus übergeimpft werden.

Beispiele aus dem Protokoll „C“:

Maus Nr. 42: 22. 6. infiziert mit Stamm „I“ Tr. equiperdum,
25. 6.: 2/1, RR. mit dem Blut der Maus Nr. 2 + + + — —
26. 6.: 30/1, RR. mit dem Blut der Maus Nr. 2 — — — — —
26. 6. sind die Trypanosomen auf Maus Nr. 43 übergeimpft worden.
Maus Nr. 43: 26. 6. infiziert mit Tryp. von der Maus Nr. 42 (RR. war negativ).
28. 6.: 1/5, RR. mit dem Blut der Maus Nr. 2 + + + + —.
Maus Nr. 70: 1. 10. infiziert mit Tr. equiperdum „I“.
4. 10.: viele/1, (RR. mit dem Blut kurierter Mäuse Nr. 52, 53 und 59 negativ). Auf Maus Nr. 71 übergeimpft.
Maus Nr. 71: 4. 10. infiziert von der vorhergehenden Maus Nr. 70 (RR. negativ).
6. 10: 1/1, RR. mit dem Blut derselben Mäuse Nr. 52, 53, 59 + + + + +.
8. 10: viele/1, (RR. mit dem Blut der Mäuse Nr. 52, 53, 59 — — — — —). Uebergeimpft auf Maus Nr. 73.
Maus Nr. 73: 8. 10. infiziert (von Maus Nr. 71).
10. 10.: 2/1, RR. mit dem Blut der Maus Nr. 49, die von demselben Trypanosomenstamm kuriert worden ist, + + + + +.

3) Werden Trypanosomen in einer gewissen Periode der Infektion genommen und mit dem Blut verschiedener, jedoch gleichzeitig und von derselben Maus infizierter und danach geheilter Mäuse gemischt, so tritt mit dem Blute mancher Mäuse eine positive, mit dem Blute anderer wiederum eine negative RR. ein. Alle die Eigentümlichkeiten des Rieckenbergschen Phänomens in bezug auf den Stamm „I“ Tr. equiperdum werden unten eine Erklärung erhalten.

Das verschiedenartige Verhalten verschiedener Stämme von Trypanosomen bei RR. ist an und für sich nicht neu für uns. Diese Erscheinung beobachtete eben Rieckenberg selbst während seiner Arbeit mit verschiedenen Stämmen Tr. Brucei. Im Gegensatz zu 1) dem Stamme Hamburg alt, 2) dem Stamme Prowazek, und 3) dem Stamme Siena, die eine stetige und scharf ausgeprägte positive RR. geben, verhalten sich der Stamm Hamburg recens[1]) und der Stamm Gnu XII in bezug auf die RR. fast ebenso wie unser Stamm „I“ Tr. equiperdum. Die Ursache solcher unsicherer Resultate der Reaktion liegt nach Rieckenbergs Ansicht in der Eigenschaft der Trypanosomen, sich unter der Einwirkung der Schutzkörper des Makroorganismus leicht zu verändern. Seiner Meinung nach behält der Parasit seine Eigenschaften während der Infektionszeit um so energischer bei, je virulenter er ist, und umgekehrt. Während der Stamm „Hamburg alt“ in der Regel eine Maus im Verlauf von 3—5 Tagen tötet, verursacht dagegen der Stamm Hamburg recens, der sich durch eine geringere Virulenz kennzeichnet, bei der Maus gewöhnlich eine chronische Erkrankung und nicht selten Schwankungen in der Anzahl der Trypanosomen im Blute. Wie bekannt, ist das Schwanken der Anzahl der Trypanosomen im Blute besonders charakteristisch für Trypanosomeninfektion bei Meerschweinchen. Nach einer Periode, während der die

1) H. Rieckenberg, Eine neue Immunitätsreaktion etc. (Ztschr. f. Immunitätsf. Bd. 26. 1917. H. 1.)
„Das ist der Stamm Hamburg, alt in Daressalam von Cl. Schilling durch die Glossina morsitans geschickt, und dann auf Ratten hierher gebracht.“

Anzahl der Trypanosomen im Blute eines Meerschweinchens steigt, folgt eine solche, wenn dieselbe allmählich abnimmt, bis schließlich die Trypanosomen vollständig aus dem Blute verschwinden.

Solch ein Verschwinden der Trypanosomen aus dem Blute ist, wie Ehrlich glaubte, durch das Entstehhen von Antikörpern bedingt, die als Schutzreaktion des Organismus bei dem Absorbieren der während der Infektion zugrunde gegangenen Trypanosomen erscheinen. Eine 6tägige Passage des Trypanosomenstammes von Prowazek durch ein Meerschweinchen hatte diesen Stamm in bezug auf die RR. derart äußerst standhaft verändert, daß er die Eigenschaft, sich mit Blutplättchen solcher Ratten, die durch den Prowazekschen Ausgangsstamm immunisiert worden waren, zu beladen, total verloren hatte (Rieckenbergs Experiment). Auf Grund dieser Experimente stellt sich Rieckenberg den Verlauf der Infektion bei Mäusen mit schwach virulenten Trypanosomenstämmen (Stamm Hamburg recens und Gnu XII) in folgender Weise vor. Werden einer Maus eine große Anzahl solcher Trypanosomen ins Blut eingespritzt, dann geht ein Teil von ihnen zugrunde, wobei das Absorbieren ihrer Reste im Organismus des Tieres Antikörper entstehen läßt; ein anderer Teil der Trypanosomen, die vielleicht widerstandsfähiger sind, bleibt am Leben und vermehrt sich. Die hierbei, wenn auch nur in geringen Mengen, entstehenden Antikörper üben auf einen Teil der Trypanosomen eine gewisse Wirkung aus, indem sie ihre Eigenschaft verändern. Je größere Quantitäten dieser Antikörper sich im Blute des Tieres bilden, desto widerstandsfähiger wird dasselbe. Je nach der Zunahme der sich anhäufenden Quantitäten der Antikörper[1]) wächst eben in entsprechendem Grade auch die Widerstandsfähigkeit des sie enthaltenden Organismus, so daß die Vermehrung der Ausgangsparasiten allmählich an Stärke abnimmt, bis sie schließlich ganz aufhört; aber die Vermehrung der schon adaptierten Parasiten wird dagegen immer stärker und stärker, bis schließlich letztere an Stelle der Ausgangsrasse treten. Ist aber der Stamm in hohem Grade virulent, so geht die Vermehrung der Trypanosomen so schnell vor sich, daß sie zu wenig Zeit haben, um sich zu verändern. Auf solche Weise stellt sich Rieckenberg die Veränderungen, welche die Trypanosomen während einer längeren Erkrankung erleiden, vor; gewissermaßen sind sie individuell variabel, entsprechend der verschiedenen Widerstandsfähigkeit der Organismen. Das Rieckenbergsche Phänomen muß kraft seiner feinen Spezifität gewissermaßen auf diese Veränderungen reagieren, und in der Tat erhalten wir bei einer schwachvirulenten Infektion einen unregelmäßigen Ausfall der RR.

Unsere Arten und Stämme von Trypanosomen zeigen fast dasselbe Verhalten, sowohl in bezug auf den Infektionsverlauf, als auch auf ihr Vermögen, sich mit Blutplättchen zu beladen, wie eben die Stämme des Tr. Brucei, welche Rieckenberg bei seinen Experimenten benutzt hatte. Unser Stamm Tr. Brucei „a", der eine stetige und stark positiv ausfallende RR. gibt, ist eben stark virulent, da er eine Maus in 4—6 Tagen tötet.

Der Stamm Tr. equiperdum „U", der eine Maus in 6—7 Tagen tötet und also dem Stamme Tr. Brucei „a" wenig an Virulenz unter-

---

1) Bei Meerschweinchen und Kaninchen, in deren Blut sich von Anfang an eine große Anzahl Antikörper bildet, geht dieser Prozeß mit großen Schritten vor sich, so daß die Trypanosomen auf ein paar Tage vollständig aus dem Blute verschwinden.

legen ist, gibt dieselben Resultate bei der RR.[1]). Der Stamm „I" Tr. equiperdum, der eine unbeständige RR. gibt, zeichnet sich auch dadurch aus, daß er eine langdauernde Erkrankung verursacht. Hierbei gehen die Mäuse erst nach Verlauf von 10—15 Tagen zugrunde, nur gegen Ende unserer Untersuchungen beschränkte sich diese Zeit auf 7 Tage. Oftmals beobachteten wir, hauptsächlich bei Beginn unserer Untersuchung, daß während der Infektionszeit die Anzahl der Trypanosomen im Blute der Mäuse, die mit diesem Stamme infiziert worden waren, schwankte. Auf diese Weise haben wir den von Rieckenberg angedeuteten Zusammenhang zwischen der Virulenz der Trypanosomen und ihrer Fähigkeit, eine konstante positive RR. zu geben, auch bei unseren Experimenten feststellen können.

Dieser Umstand gibt uns nochmals die Ueberzeugung, daß Rieckenbergs Meinung: die Inkonstanz des Phänomens sei von den Veränderungen, denen die Trypanosomen während der Infektion unterliegen, abhängig, ganz richtig ist.

Obwohl unsere Ansichten über die Veränderungen, denen die Trypanosomen während der Infektionsezit unterliegen, mit Rieckenbergs Grundsätzen vollkommen übereinstimmen, halten wir es für notwendig, die Schlußfolgerungen dieses Verfassers durch die Ergebnisse unserer Versuche zu ergänzen.

Vor allem müssen wir zugeben, daß auch bei einem virulenten Stamm — einen solchen stellt unser Stamm Tr. Brucei „a" vor — ein geringer Teil der Trypanosomen ebenfalls gewissen Veränderungen unterliegt. Wenn ein Teil der Trypanosomen bei der Ueberimpfung zugrunde geht und die Absorbierung derselben das Entstehen von Antikörpern verursacht, so ist es sehr wahrscheinlich, daß manche von den sich gewöhnlich schnell vermehrenden Trypanosomen, vielleicht solche, die der Einwirkung der Antikörper mehr unterlegen sind, in ihrer Entwicklung einen Stillstand machen, um nach Verlauf von einem gewissen Zeitraum, während dessen sie sich den neuen Verhältnissen der Umgebung, d. h. den Schutzkörpern des Organismus, angepaßt haben, den Ursprung einer neuen Varietät zu geben. Letztere wird infolge eines solchen Stillstandes und auf Grund ihrer geringen Anzahl weiterhin der Ausgangsrasse in seiner Entwicklung bedeutend unterlegen sein, da diese sich frei und unbehindert vermehrt. Also gehört während solcher Infektionsperiode der Hauptteil der Trypanosomen zu der Ausgangsrasse, die sich leicht mit Blutplättchen beladen läßt, und nur ein kleiner Teil derselben gehört der neuen Varietät an, die frei von Blutplättchen bleibt. Auf Grund der Anwesenheit einer solchen biochemischen Trypanosomenvarietät und einer gleichzeitigen Existenz von Trypanosomen der Ausgangsrasse erklären wir uns 1 oder 2 Minus, die wir dann und wann antreffen, wenn wir mit Stamm Tr. Brucei „a" und Stamm Tr. equiperdum „U" arbeiten (s. Tab. VIa, VIb und VII).

Wenn bei rasch fortschreitender Infektion die Trypanosomen der Ausgangsrasse, die fortdauernd eine beständige positive RR. geben, fast stets das Uebergewicht erlangen, so entstehen dagegen bei einer langdauernden Infektion, die für den Stamm Tr. equiperdum „I" charakteristisch ist, umgekehrte Verhältnisse. Hierbei wird die Entwicklung der Trypanosomen der Ausgangsrasse dank der unterdrückenden Einwirkung der sich anhäufenden Antikörper beschränkt, wogegen die

---

1) Siehe Tabelle Nr. VII.

Trypanosomen der neuen Varietätsform sich unbehindert vermehren. In solchen Fällen werden Trypanosomen, die am Beginn und zum Ende der Infektionszeit entnommen worden sind, in bezug auf ihr Verhalten zur RR. sich voneinander unterscheiden. In der Tab. Nr. VIII haben wir gerade solche Verhältnisse zur Hand. Beim Uebertragen der Trypanosomen auf der Höhe der Infektion von der kranken Maus auf eine gesunde Maus führen wir der letzteren sowohl die veränderten Trypanosomenrassen, als auch die unterdrückten Rassen ein. Diese letzteren befreien sich jetzt im neuen Organismus von der paralysierenden Einwirkung der Antikörper und fangen an, sich beschleunigt zu vermehren. Nur die Anwesenheit solcher unterdrückten Trypanosomenrassen ermöglicht es uns, der eigentümlichen Eigenschaft der Trypanosomen, die die Fähigkeit, eine positive RR. zu geben, schon vermissen ließen, aber nach Ueberimpfung auf ein frisches Tier alle ihre früheren Eigenschaften hinsichtlich der RR. wiederherstellen, eine Erklärung zu geben (S. 41, Prot. „C").

Außer der Virulenz der Parasiten selbst gibt es noch einen anderen Umstand, der einen Einfluß auf die in größerem oder minderem Grade eintretende Veränderung der Trypanosomen ausübt — das ist die Widerstandsfähigkeit des Trypanosomenträgers. Hinsichtlich dieses Umstandes, der bei verschiedenen Individuen eine große Mannigfaltigkeit darbietet, sind die Trypanosomen in verschiedenen Organismen lange nicht identischen Veränderungen unterlegen. In der einen Reihe der Fälle beschränken sich diese Veränderungen der Trypanosomeneigenschaften auf eine Phase: die Trypanosomen der Ausgangsrasse werden von Rezidivtrypanosomen ersetzt. In einer anderen Reihe der Fälle müssen wir uns den Prozeß der Anpassung der Parasiten etwas komplizierter vorstellen. Die zweite Trypanosomenrasse, die sich den ersten Portionen der Antikörper angepaßt hat, unterliegt weiterhin der Einwirkung neuer Quantitäten sich anhäufender Antikörper, denen sie sich wiederum allmählich anpaßt, und gibt somit den Ursprung einer dritten, in einem noch höheren Grade widerstandsfähigen Trypanosomenrasse. Diese letztere pflanzt sich jetzt mit großer Hastigkeit fort, da sie ja die am meisten widerstandsfähige ist und den vorhergehenden Rassen in dieser Hinsicht weit überlegen ist. — Die Vermehrung der vorhergehenden Rassen nimmt dagegen auf Grund der hemmenden Einwirkung der Antikörper immer mehr und mehr ab, bis sie schließlich zum Stillstand kommt. Die Anwesenheit am Ende der Infektionsperiode entweder nur der letzten Trypanosomenrasse, oder ein gleichzeitiges Vorhandensein auch der vorhergehenden Rassen ist durch das Verhältnis von zwei Faktoren: der Virulenz der Trypanosomen, und der Widerstandsfähigkeit des Organismus, der dieselben enthält, bedingt.

Der soeben beschriebene Prozeß der Anpassung der Parasiten an die Antikörper, der als ein Kampf des Mikroorganismus mit dem Makroorganismus zu betrachten ist, muß, wie wir gesehen haben, ein allmähliches Verschwinden der weniger anpassungsfähigen Trypanosomen aus dem Blute zur Folge haben. Das Zugrundegehen der Trypanosomen, das entweder selbständig oder infolge eines medikamentösen Eingriffes zustande gekommen ist, ruft wiederum im Blute des Organismus gewisse Reagine zum Vorschein, die die positiv ausfallende RR. verursachen, wenn hierzu die entsprechenden Trypanosomen genommen werden.

Dementsprechend wird das Blut einer geheilten Maus gleichzeitig Rieckenbergsche Reagine sowohl für die Trypanosomen, die infolge

der medikamentösen Kur zugrunde gegangen sind, als auch für die Zwischenrassen, die während der Infektion sich bildeten und umkamen, enthalten.

Alles, was über die Infektionsvorgänge von schwach virulenten Trypanosomen gesagt worden ist, gilt ebenso für unseren Stamm Tr. equiperdum „I".

Folglich müssen wir bei der Bewertung der Resultate der RR. mit Stämmen des Tr. equiperdum „I" eine Reihe von Momenten in Betracht ziehen.

a) Im Tierorganismus kann dieser Stamm eine Reihe biochemischer Varietäten geben; b) die Anzahl dieser Varietäten kann bei parallel infizierten Tieren, je nach den individuellen Eigenschaften der einzelnen Tiere, bedeutend schwanken; c) gegen Ende der Infektionszeit können im Blute gleichzeitig sowohl hinsichtlich der RR. veränderte Trypanosomenrassen, als auch von den Antikörpern unterdrückte Rassen anzutreffen sein; d) letztere vermehren sich von neuem, falls sie auf ein frisches Tier übertragen werden; e) das Blut einer Maus enthält gleichzeitig eine Reihe Rieckenbergscher Reagine bezüglich derjenigen Trypanosomenrassen, die während der Infektionsdauer im Organismus des Tieres einerseits entstanden, andererseits zugrunde gegangen sind.

Wie es unmöglich ist, alle die Einwirkungen, denen die Trypanosomen während einer Passage durch eine Reihe von Mäuseorganismen unterworfen sind, im ganzen in Betracht zu ziehen, so kann anderseits der Ausgang des Experimentes mit solch einer labilen Rasse wie Tr. equiperdum „I" vorausgesagt werden. Einen positiven Ausfall des Phänomens werden wir demgemäß in solchen Fällen erhalten, wenn eine bestimmte Trypanosomenrasse mit dem Blute solcher kurierten Maus gemischt wird, die während der einen oder anderen Infektionsperiode dieselbe Trypanosomenrasse enthalten hat. Ein so günstiges Verhältnis wird sich aber auf Grund des oben Gesagten wohl nicht in allen Fällen vorfinden.

Hieraus wird uns auch die Tatsache verständlich, daß der Trypanosomenstamm equiperdum „I", falls er zu einer gewissen Infektionsperiode entnommen und mit dem Blut verschiedener Mäuse gemischt wird, in einigen Fällen eine positive, in anderen wiederum eine negative RR. gibt, trotzdem die Mäuse mit demselben Stamme immunisiert worden sind.

Um unsere Theorie, auf der die Erklärung des eigenartigen Verhaltens des Trypanosomenstammes equiperdum „I" bezüglich der RR. basiert, überzeugender zu machen, hielten wir es für äußerst wichtig, dasselbe Verhalten beim virulenten Stamm Brucei „a" zu prüfen, jedoch auf Kosten eines anderen Faktors, der auf den Verlauf der Infektion seine Einwirkung ausüben sollte, nämlich einer künstlichen Steigerung der Widerstandsfähigkeit der Mäuse gegenüber diesem Stamm.

In einer früheren Arbeit haben Prof. Kritschewsky u. Dr. Brussin[1]) nachgewiesen, daß eine alkalische Salvarsanlösung, nachdem sie einer Maus in einer Dosis von 0,05 pro 1 g Körpergewicht und in einer Konzentration von 1:800 subkutan injiziert worden ist, den

1) Kritschewsky u. Brussin, Zur Revidierung der Lehre von der Organotropie und Parasitotropie des Salvarsans (Ztschr. f. Immunitätsforsch. Orig. Bd. 39. 1924. H. 3.)

Organismus derselben nach Verlauf von 11—12 Tagen verläßt. Saure Salvarsanlösungen verbleiben dagegen bei demselben Verfahren im Organismus der Maus eine längere Zeit, dank der Fähigkeit der Bindegewebszellen der Haut und des Subkutangewebes, dieselben zu adsorbieren.

Auf Grund der obenerwähnten Tatsachen müssen wir also vermuten, daß im Blute einer auf solche Weise mit saurem Salvarsan behandelten Maus am 11. Tage nach der Infektion noch ein solches Quantum desselben vorhanden ist, welches, wenn auch zu gering, um die Maus, falls sie jetzt mit Trypanosomen infiziert wird, vor einer Erkrankung zu schützen, jedoch hinreicht, um gewissermaßen die Widerstandsfähigkeit des Organismus zu steigern und den Verlauf der Infektion auf einen anderen Weg zu leiten.

Auszug aus dem Protokolle „D".

Normale (gesunde) Maus Nr. 12 wurde 27. 5. mit Tr. Brucei „a" von Maus Nr. 11 infiziert.

30. 5.: 6/10, RR. mit Nr. 11 + + + + +.
31. 5.: 20/1, kuriert.

Maus Nr. 13 wurde am 11. Tage nach vorheriger Einspritzung einer sauren Salvarsanlösung 1:800 in Dosis 0,05 pro 1 g Gewicht 27. 5. von der Maus Nr. 11 infiziert (zufälligerweise erhielt sie bedeutend mehr Impfmaterial als die Maus Nr. 12).

30. 5.: 5/1, RR. mit Nr. 11 + + + + —.
31. 5.: 6/1, 1. 6. am Morgen: 5/20, am Abend: 1/25. Bei der Mischung ihres Blutes mit Tryp. des Ausgangsstammes Nr. 4 war RR. + + + + —
3. 6.: 0, 5. 6.: 5/10, 7. 6.: 1/1, (RR. mit Nr. 11 — — — — —), 18. 6.: 16/1, (RR. mit Nr. 11 — — — — —), kuriert mit 0,9 g Neosalvarsanlösung (Novoarsolan) 1:800; 9. 6.: 0, 18. 6.: 0, 19. 6.: 3/40, 21. 6.: 0, 25. 6.: 1/1, kuriert mit 0,9 g Neosalvarsanlösung 1:800, 26. 6.: 1/20, 28. 6.: viele/1, 30. 6.: †.

Wie hinsichtlich des Verlaufs der Infektion selbst, so auch in bezug auf das Verhalten der Trypanosomen zur RR. wird bei diesen parallel infizierten Mäusen ein gewisser Unterschied beobachtet. Anfangs, am 30. 5., scheint die Maus Nr. 13 bezüglich des Verlaufes der Infektion der Kontrollmaus Nr. 12 überlegen zu sein, was wahrscheinlich vom größeren Quantum des eingeführten Materials abhängig ist. Jedoch schon am ersten Tage der Infektion äußerte sich das Entstehen eines größeren Quantums Antikörper bei der Maus Nr. 13. Während die Trypanosomen der Maus Nr. 12 bei Mischung mit dem Blut der Maus Nr. 11, die von dem Ausgangsstamm kuriert worden ist, eine positive RR. +++++ geben und sich mit Blutplättchen beladen, verbleibt ein Teil der Trypanosomen der Maus Nr. 13 im Gemisch mit dem Blute derselben kurierten Maus Nr. 11 frei von denselben. Diese frei verbleibenden Trypanosomen dürften unserer Meinung nach als Trypanosomen betrachtet werden, die sich umgewandelt haben und die von Trypanosomen herstammen, die unter dem Einfluß der Antikörper, welche unter Einwirkung der in der Periode der Infektion zugrunde gegangenen Trypanosomen entstanden sind. Wahrscheinlich töteten die im Organismus zirkulierenden Ueberreste von Salvarsan ein größeres Quantum Trypanosomen, als im Moment einer gewöhnlichen Ansteckung zugrunde gehen. Infolge des größeren Quantums adsorbierten Antigens sind eben ansehnliche Quantitäten Antikörper entstanden. Dieser Unterschied in der Menge der gebildeten Antikörper, der sich am ersten Tage der Infektion nur andeutete, tritt mit besonderer Deutlichkeit

während des weiteren Verlaufs der Infektion zum Vorschein. Am 31. 5. vermehren sich die Trypanosomen der Maus Nr. 12 (Kontrolle) im gewöhnlichen Tempo (20 und mehr Trypanosomen im Gesichtsfelde). Was das Trypanosomen der Maus Nr. 13 anbetrifft, so unterliegen sie in ihrer Entwicklung einem Stillstand, den wir der hemmenden Einwirkung der angesammelten Antikörper zuschreiben. In der Tat sehen wir auch, daß am anderen Tage, den 1. 6., das Blut der Maus Nr. 13, in welchem sich noch Trypanosomen vorfinden, bei Mischung mit dem Ausgangsstamm Tr. Brucei die RR. folgenden Ausfall gibt: ++++—. Auf diese Weise können schon am 3. Tage nach der Infektion im Blute der Maus Nr. 13 Rieckenbergsche Reagine vorgefunden werden.

Wie wir weiter sehen werden, deutet die Anwesenheit der Reagine, die den positiven Ausfall des Rieckenbergschen Phänomens bedingen, auf im Blute vorhandene Antikörper. Es erweist sich also, daß unter Einwirkung der Antikörper die Trypanosomen der Maus Nr. 13 anfänglich in ihrer Entwicklung unterdrückt werden, weiterhin sogar völlig aus dem Blute verschwinden, um jedoch nach Verlauf von zwei Tagen wieder zum Vorschein zu kommen. Diese von neuem auftretenden Trypanosomen können mittels der RR. von denen des Ausgangsstammes unterschieden werden: das sind eben solche Exemplare, die sich den Antikörpern angepaßt haben, also umgewandelte Trypanosomen, die die Fähigkeit, mit Blutplättchen einer von dem Ausgangsstamm kurierten Maus beladen zu werden, verloren haben.

Nach Ueberimpfung der infolge einer kurzdauernden Remission entstandenen Trypanosomen von der Maus Nr. 13 auf Maus Nr. 13a überzeugten wir uns nach dem Erscheinen derselben bei dieser letzteren abermals, daß diese Trypanosomen andere, nämlich umgewandelte waren. Zwar haben sie das Vermögen, Blutplättchen der Maus Nr. 13, in deren Blute gleichartige Trypanosomen waren, anzukleben, beibehalten, geben aber mit dem Blute der Maus Nr. 16, die von der Ausgangsrasse kuriert worden ist, eine negative RR. (s. Tab. Nr. IX). Folglich haben wir im Blute der kurierten Maus Nr. 13 das Vorhandensein der Rieckenbergschen Reagine gegenüber den veränderten Rezidivtrypanosomen, die noch vor Beginn der Kur im Blute der Maus Nr. 13 vorhanden waren, feststellen können.

Nach unseren Anschauungen dürfte das Blut der Maus Nr. 13 Reagine gegenüber der Ausgangsrasse des Tr. Brucei „a“, welche der Organismus dieser Maus beim Beginn der Infektion enthielt, die aber weiterhin spontan verschwunden ist, besitzen. Tatsächlich geben auch Trypanosomen der Maus Nr. 17, die mit der Ausgangsrasse infiziert worden ist, mit dem Blute der Maus Nr. 13 eine nicht weniger scharf auffallende RR. als mit dem Blute der Maus Nr. 16, die von der Ausgangsrasse des Tr. Brucei „a“ kuriert worden ist (s. Tab. Nr. IX, S. 48).

An dem Beispiele des Infektionsverlaufes bei der Maus Nr. 13 bekommen unsere theoretischen Auffassungen über die Veränderungen, denen die Trypanosomen während der Infektionsdauer unterliegen, demgemäß eine genügende experimentelle Begründung. Auf solche Weise muß die Unbeständigkeit des Ausfallens der RR. beim Arbeiten mit labilen Rassen des Tr. equiperdum „I“ ausschließlich in der außerordentlich feinen Sensibilität des Rieckenbergschen Phänomens gegenüber der geringsten Veränderung der Trypanosomen während des In-

Tabelle IX.

Eine gleichzeitige Anwesenheit in einem Organismus von RR.-Reaginen gegenüber verschiedenen Rassen.

Nummern d. Mäuse, die die Trypanosom. lieferten	Anzahl der Trypanosomen im Gesichtsfelde	Trypanosomenrasse	Nummern der kurierten Mäuse	Angabe des Rezidivs, von dem die Maus kuriert wurde	RR.
13a	3/1	Von Nr. 13 übertragen, als sie das 1. Rezidiv gegeben hatte	13	Kuriert nach Ablauf des 1. Rezidivs[1])	+ + + — —
13a Kontrolle	3/1	dgl.	16	Kuriert von der Ausgangsrasse	— — — — —
17	1—2/1	Ausgangsrasse Stamm Tr. Brucei „a"	13	Kuriert nach Ablauf des 1. Rezidivs	+ + + + —
17 Kontrolle	dgl.	dgl.	16	Kuriert von der Ausgangsrasse	+ + + + +

fektionsverlaufs ihre Erklärung finden. Es genügt, hierbei die Widerstandsfähigkeit des Trypanosomenstammes gegenüber den Schutzmiteln des Organismus durch eine große Anzahl aufeinanderfolgender Mäusepassagen zu steigern, um danach ein weit regelmäßigeres Eintreten der RR. zu erhalten. Die Rasse Tr. equiperdum „U", die ihren Stamm von dem Stamme equiperdum „I" ableitet, jedoch während eines Jahres auf Mäusen erhalten worden ist, liefert eine vollkommene Bestätigung der oben erwähnten Tatsache. Freilich muß zugegeben werden, daß auch die Rezidive, die dieser Stamm „U" in Mäusen überlebt hat, einen gewissen Anteil an seiner Anpassungsfähigkeit besitzen.

Unser Stamm „I", der zurzeit ca. 90 Passagen durchgemacht hat, hat auch hinsichtlich der Fähigkeit, ein positives Rieckenbergsches Phänomen zu geben, eine bedeutende Veränderung erfahren. In der Regel erhalten wir jetzt bei der Arbeit mit diesem Stamme eine regelmäßige positive RR. am Anfang und zu Ende der Infektion.

Die außerordentlich feine Spezifität des Rieckenbergschen Phänomens, welches im Grunde genommen eine biologische Immunitätsreaktion ist, läßt unwillkürlich die Frage stellen, ob es sich auch bei der Immunität gegen sekundäre Trypanosomeninfektionen nicht um dieselbe feine Spezifität der Antikörper handelt. Um diese Frage beantworten zu können, wurde eine Reihe von Mäusen, die von dem Stamme Tr. equiperdum „I" geheilt waren, zu verschiedenen Zeitpunkten nach beendeter Kur folgendermaßen sekundär infiziert:

1) Ein Teil derselben wurde mit solch einer Rasse Tr. equiperdum „I" infiziert, die eine scharf ausgeprägte RR. mit dem Blute der Mäuse, die sekundär infiziert werden sollten, gab (siehe Tab. Nr. XI a). — 2) Ein anderer Teil wurde mit einer Rasse Tr. equiperdum „I", die eine negative oder eine unvollständige RR. gab, infiziert. Das will sagen, daß die sekundäre Infektion zu einer Zeit ausgeführt wurde, als die Maus, die die zur Infektion nötigen Trypanosomen lieferte, in ihrem Blute ein größeres oder kleineres Quantum veränderter Trypanosomen

1) Das bei ihr nach einem spontanen Verschwinden der Ausgangsrasse aus dem Blute auftrat.

enthielt (siehe Tab. Nr. XIb). — 3) Der Rest wurde ebenfalls mit der Rasse Tr. equiperdum „I“ infiziert, doch mit einer solchen, die auf einem Meerschweinchen unterhalten wurde und die einen negativen Ausfall der RR. mit dem Blute einer Maus, die sekundär infiziert werden sollte, gab (siehe Tab. XIc).

Alle Mäuse wurden mit der Rasse Tr. equiperdum infiziert und auf dem Höhepunkt der Infektion mit 0,05 ccm Salvarsanlösung 1:800 pro 1 g Gewicht behandelt.

Tabelle XIa.

Nr. der kurierten Mäuse	Tag, an dem die Mäuse nach durchgeführter Behandlung infiziert wurden			Tierart, von der die Trypanosomen entnommen waren	Anzahl d. Trypanosomen im Gesichtsfelde	Ausfall der RR.	Resultat der Infektion
	2. Mal	3. Mal	4. Mal				
1a	15	.	.	Maus	3/1	+ + + + +	erkrankte nicht
36	16	.	.	dgl.	11/20	+ + + + +	dgl.
92	18	.	.	„	2/1	+ + + + +	„
62	18	.	.	„	3/10	+ + + + +	„
69	19	.	.	„	1/10	+ + + + +	„
69a	23	.	.	„	8/10	+ + + + +	„
68	24	.	.	„	1/10	+ + + + +	„
83	25	.	.	„	5/1	+ + + + +	„
81	28	.	.	„	2/1	+ + + + +	„
28	28	.	.	„	2/1	+ + + + +	„
54	1½ Mon.	.	.	„	13/10	+ + + + +	„
62	.	1 Mon. 17 Tage	.	„	8/10	+ + + + +	„
69a	.	2 Mon.			2/1	+ + + + +	„
68	.	2 Mon. 17 Tage	.	„	2/1	+ + + + +	erkrankte am 10. Tage
62	.	.	2 Mon. 3 Tage	„	2/1	+ + + + +	dgl.
69a	.	.	3 Mon. 9 Tage	„	3/1	+ + + + +	erkrankte am 6.—7. Tage

Tabelle XIb.

52	2 M. 17 T.	.	.	Maus	2/1	— — — — —	erkrankte am 10. Tage
54	.	4 M. 2 T.	.	„	2/1	— — — — —	erkrankte am 4. Tage
48	4 M. 3 T.	.	.	„	2/1	— — — — —	erkrankte am 4.—5. Tage
94	13 Tage	.	.	Maus Nr. 98	viele /1 1 Tropfen	— — — — —	erkrankte am 21. Tage
90	23 „	.	.	dgl.	viele /1 1 Tropfen	— — — — —	erkrankte am 11. Tage
92	18 „	(Kontrolle)	.	„	2/1 10 Tropf.	+ + + + +	erkrankte nicht
95	28 „	.	.	Maus Nr. 102	viele /1 ½ Tropf.	— — — — —	erkrankte am 7. Tage
97	20 „	.	.	dgl.	viele /1 ½ Tropf.	— — — — —	dgl.
96	25 „	.	.	„	viele /1 ½ Tropf.	— — — — —	erkrankte am 15. Tage
2a	17 „	.	.	„	Mehrh./1 1 Tropfen	+ + — — —	erkrankte am 12. Tage
3a	16 „	(Kontrolle)	.	„	viele /1 ½ Tropf.	+ + + + +	erkrankte nicht
1a	15 „	(Kontrolle)	.	„	3/1 15 Tropf.	+ + + + +	dgl.

Tabelle XIc.

Nr. der kurierten Mäuse	Tag, an dem die Mäuse nach durchgeführter Behandlung infiziert wurden			Tierart, von der die Trypanosomen entnommen waren	Anzahl d. Trypanosomen im Gesichtsfelde	Ausfall der RR.	Resultat der Infektion
	2. Mal	3. Mal	4 Mal				
89	15 Tage	.	.	Meerschw. Nr. 571	1/3	— — — — —	erkrankte am 5. Tage
89	.	21 Tage	.	von demselb. nach einer Remission	1/8	— — — — —	erkrankte am 8. Tage[1])
88	19 Tage	.	.	Meerschw. Nr. 571	1/3	— — — — —	erkrankte am 7. Tage
88	.	21 Tage	.	von demselb nach einer Remission	1/8	— — — — —	erkrankte am 11. Tage

Aus diesen Versuchen folgt also, daß früher als nach Verlauf einer bestimmten Frist, nämlich von 2—3 Mon. nach durchgeführter Kur, eine mehrfach unternommene Reinfektion nicht gelingt, wenn zum Versuch eine Rasse Tr. equiperdum „I", die mit dem Blute einer Maus, die sekundär infiziert werden soll, eine absolut positive RR. gibt (Beispiele 1a, 36, 92, 62, 69, 68, 83, 81, 28, 54, 69a Tab. XIa). Erst der 3. Versuch, Maus Nr. 68, und der 4., Mäuse Nr. 62 und 69a nach Verlauf von $2^1/_2$—3 Monaten nach überstandener Kur zu infizieren, gaben in diesem Falle, wo die RR. positiv war, ein günstiges Resultat. Diese 3 Fälle deuten möglicherweise auf eine beträchtliche Sensibilität des Phänomens[2]). die eben eine solche Anhäufung der Antikörper angibt, deren Quantum jedoch zu gering ist, um einer sekundären Infektion Widerstand zu leisten. Gewöhnlich ist die RR. nach Verlauf von $2^1/_2$ bis 3 Monaten nach einer stattgefundenen Kur eine negative, während die Reinfektion mit derselben unveränderten Trypanosomenrasse unbehindert gelingt (siehe Beispiele Nr. 52, 54 (2. Versuch) und Nr. 48 in der Tab. Nr. 11b).

Demgegenüber ist eine Reinfektion zu beliebiger Zeit ermöglicht, jedoch nicht eher als am 11.—12. Tage (da eine Salvarsanlösung aus dem Körper des Tieres nicht eher als am 11. Tage nach ihrer Einführung ausgeschieden wird), falls Rassen desselben Trypanosomenstammes, die sich jedoch von der Ausgangsrasse hinsichtlich der RR. unterscheiden, in Anspruch genommen werden. Infolgedessen unterliegen die Mäuse Nr. 88 und 89 (siehe Tab. Nr. XIc) abermals einer Reinfektion, die eine am 15., die andere am 19. Tage nach überstandener Kur, wenn sie mit der Rasse Tr. equiperdum „I", die eine Passage durch ein Meerschweinchen gemacht hat, infiziert werden. Es gelingt jedoch 21 Tage nach der Kur eine Reinfektion derselben Mäuse wiederum mit der Rasse Tr. equiperdum „I" von demselben Meerschweinchen, das unterdessen eine Remission durchgemacht hat. Die infolge dieser Remission entstandene Trypanosomenrasse hat sich als verändert erwiesen; sie gab mit dem Blute der Mäuse Nr. 88 und 89 ein negatives Phänomen; die ge-

1) Die infolge der Infektion erschienenen Trypanosomen geben mit dem Blute des Meerschweinchens Nr. 571 RR. + + + — —.

2) Die Möglichkeit einer infolge von uns übersehenen Anwesenheit von umgewandelten Trypanosomen eingetretenen Infektion ist in diesen 3 Fällen nicht ausgeschlossen.

lungene Reinfektion erwies aber, daß gegenüber dieser Rasse die Schutzmittel, die gegenüber den vorhergehenden Rassen sich im Körper gebildet hatten, unwirksam waren.

Das von uns gegen Ende der Infektionszeit festgestellte Vorhandensein einer unter dem Einfluß der Antikörper veränderten Trypanosomenrasse wird auch in vollem Maße durch die Methode der sekundären Infektion bestätigt.

Die Reinfektion mit der Rasse Tr. equiperdum „I", die zu Anfang der Infektion bei absolut positiver RR. entnommen werden, fällt keineswegs positiv aus, ungeachtet eines großen Quantums eingeführten Materials (10—15 Tropfen, Maus 1a, 92 Tab. XIb). Indessen fällt die Reinfektion immer günstig aus, falls dieselben Trypanosomen von derselben Maus entnommen werden, jedoch gegen Ende der Infektion, und wenn die RR. mit dem Blute der der Infektion unterliegenden Maus schwach ausgeprägt oder negativ ist. Hierbei gelingt die Reinfektion eben bei minimalen Quantitäten von Material ($^1/_2$—1 Tropfen) und stellt sich in früheren Zeitpunkten nach der Kur ein, als es im vorhergehenden Versuche der Fall war (siehe Tab. XIb, Nr. 94, 95, 90, 2a, 96 und 97). In diesen Fällen muß der Erfolg der Reinfektion auf Rechnung der veränderten Trypanosomen gestellt werden, die die Fähigkeit, mit Blutplättchen einer kurierten und der Reinfektion unterliegenden Maus beladen zu werden, verloren haben. Fast dieselben Resultate haben wir beim Versuche, diese Frage über die Spezifität der Immunität mittels einer anderen Methode zu beantworten, erhalten.

Wir mischten Blut von Mäusen, die von dem Stamme Tr. equiperdum „I" kuriert worden waren, mit Trypanosomen desselben Stammes in Zitratbouillon und führten diese Mischung normalen Mäusen subkutan ein.

Auszug aus den Protokollen.

Maus Nr. 62, erhielt am 48. Tage nach durchgeführter Kur subkutan eine Mischung von Blut der Maus Nr. 62 mit Tryp. von der Maus Nr. 67 bei RR. + + + + + injiziert. Im Verlauf von 2 Wochen ist keine Infektion erfolgt.

Maus Nr. 64, erhielt am 11. Tage nach durchgeführter Kur subkutan eine Mischung von Blut der Maus Nr. 64 mit Trypanosomen von der Maus Nr. 67 bei RR. + + + + + injiziert. Im Verlauf von 2 Wochen ist keine Infektion eingetreten.

Maus Nr. 65, erhielt am 8. Tage nach durchgeführter Kur subkutan eine Mischung von Blut der Maus Nr. 65, die von Tr. equiperdum „I" kuriert worden war, mit Tryp. von der Maus Nr. 67 bei RR. + + + + + injiziert. Im Verlauf von 10 Tagen ist keine Infektion erfolgt. † an unbekannter Ursache.

Maus Nr. 66 (Kontrolle), erhielt am 20. Tage nach durchgeführter Kur subkutan eine Mischung vom Blute einer Maus, die von Tr. Brucei kuriert worden war, mit Tr. equiperdum „I" von der Maus Nr. 67 injiziert. Die Infektion erfolgte am 5. Tage.

Maus Nr. 14, erhielt am 14. Tage nach durchgeführter Kur subkutan eine Mischung vom Blute einer Maus, die von Tr. equiperdum „I" kuriert worden war, mit Trypanosomen der Maus Nr. 5 bei einem Trypanosomengehalt bis 5/1 und bei RR. + + + + + injiziert. Im Verlauf von 2 Monaten ist keine Infektion erfolgt.

Maus Nr. 9, erhielt 10. 4., am 11. Tage nach durchgeführter Kur, subkutan eine Mischung vom Blute der Maus Nr. 3 mit Trypanosomen der Maus Nr. 7 bei einer Anzahl von Tryp. 3/1 und bei RR. + + + + — injiziert. Die Reinfektion ist zwischen dem 11.—12. Tage eingetreten.

21. 4.: 1/2, RR. mit dem Blute der Maus Nr. 7 + + + + —.
21. 4.: 1/2, „ „ „ „ „ „ „ 3 — — — — —
23. 4.: viele/1, RR. mit dem Blute der Maus Nr. 7 + + + — —
23. 4.: viele/1, RR. mit dem Blute der Maus Nr. 3 — — — — —

Maus Nr. 10, erhielt 10. 4., am 10. Tage nach durchgeführter Kur subkutan eine Mischung vom Blute der Maus Nr. 2 mit Tryp. der Maus Nr. 7 bei RR. + + + — — injiziert. Die Reinfektion ist am 7. Tage eingetreten.

17. 4.: 3/1, RR. mit dem Blute der Maus Nr. 7 + + + + +
RR. mit dem Blute der Maus Nr. 2 — — — — —
18. 4.: 20/1, RR. mit dem Blute der Maus Nr. 7 + + + — —
RR. mit dem Blute der Maus Nr. 2 — — — — —

Es erweist sich also, daß eine Infektion gesunder Mäuse mit einer Mischung von Blut einer immunen Maus mit Trypanosomen nur bei Anwesenheit eines unvollständigen Rieckenbergschen Phänomens gelingt. Dieser Umstand läßt in diesen Fällen die Infektion auf Rechnung der freien, folglich der umgewandelten Trypanosomen setzen. Bei der Prüfung der infolge der Infektion der Mäuse Nr. 9 und Nr. 10 entstandenen Trypanosomen mittels der RR. haben wir die Möglichkeit erhalten, uns über die Richtigkeit unserer Voraussetzung zu überzeugen. Trypanosomen, die infolge einer Infektion zum Vorschein gekommen sind, geben mit dem Blute der Mäuse, die die Trypanosomen liefern, eine positive, mit dem Blute immuner Mäuse dagegen eine negative RR. Derartige Verhältnisse sind selbstverständlich, da nur die Maus, die die Trypanosomen liefert und die bereits kuriert ist, diejenigen umgestalteten Trypanosomen besitzt, die imstande sind, eine Reinfektion herbeizuführen.

Es ist uns also gelungen, mit Hilfe der gleichzeitig angewandten Methoden der sekundären Infektion und des Rieckenbergschen Phänomens den Beweis für eine beinahe übereinstimmende Analogie der Spezifität zwischen Reaginen und Antikörpern darzutun. Gleichzeitig ist auch mit Hilfe eines solchen biologischen Reagenz der „Unempfindlichkeit des Organismus" die Umwandlungsfähigkeit der Trypanosomen bewiesen, eine Eigenschaft, welche schon vordem der Ausfall des Rieckenbergschen Phänomens vermuten ließ.

Alle obenerwähnten Experimente sprechen mit voller Bestimmtheit dafür, daß bei Mäusen, die von dem Tr. equiperdum „I" kuriert worden sind, eine Immunität gegenüber einer Reinfektion im Verlaufe der nächsten $2^1/_2$—3 Monaten zurückbleibt. Die Analogie der feinen Spezifität zwischen den Rieckenbergschen Reaginen und den Antikörpern, die eine Unmöglichkeit der Reinfektion bedingen, läßt naturgemäß folgende Frage erheben, die schon von Rieckenberg berührt worden ist. Besteht nicht die Möglichkeit, mit Hilfe der einfachen und bequemen RR. die Immunität bei sekundärer Erkrankung nach Trypanosomeninfektion einem ausführlichen Studium zu unterziehen? Vorhin hatten wir festgestellt, daß das Vermögen des Blutes von Mäusen, die von dem Trypanosomenstamm „I" kuriert worden sind, mit den entsprechenden Trypanosomen eine positive RR. zu geben, innerhalb von $2^1/_2$—3 Monaten verschwindet. Dieser Zeitraum steht, wie wir sehen, in Uebereinstimmung mit dem, den wir soeben für die Immunität gegen eine Reinfektion festgestellt haben. Die Uebereinstimmung der Zeit, innerhalb der wir im Blute der kurierten Tiere einerseits die Rieckenbergschen Reagine, andererseits Antikörper vorfinden, und schließlich die beinahe völlige Analogie der Spezifität der einen wie der anderen veranlassen uns, den Gedanken auszusprechen, die RR. im zweiten Stadium der Immunität bei Trypanosomeninfektionen anzuwenden.

Ein Versuch, den wir in dieser Richtung angestellt haben, bestätigt, wie es uns scheint, unsere Aeußerung. Nachdem wir auf Grund des Rieckenbergschen Phänomens bestimmte Angaben über die Immuni-

tätserscheinungen, die nach Infektion mit dem Stamme Tr. equiperdum „I" erfolgen, erhalten hatten, haben wir dieselben mittels der Methode der sekundären Infektion geprüft und übereinstimmende Resultate erzielt.

Außer der Möglichkeit, die Immunitätserscheinungen einer gründlicheren Forschung zu unterwerfen, bietet die RR. ein sehr wertvolles Mitel zur Differenzierung verschiedener Trypanosomenrassen dar, da sie gestattet, Rezidivrassen von dem Ausgangsstamm und verschiedene Rezidivrassen untereinander zu unterscheiden.

Zusammenfassung.

1) Im Blute experimentell infizierter und alsdann kurierter oder chronisch infizierter Mäuse treten Reagine auf, die sich dadurch äußern, daß die Trypanosomen in einer Zitratbouillonaufschwemmung des Blutes dieser Mäuse mit Blutplättchen beladen werden. — 2) Eine und dieselbe Maus kann gleichzeitig eine Reihe von Reaginen besitzen, entsprechend allen Trypanosomenrassen, die während der Infektionsperiode abwechselnd entstanden und zugrunde gegangen sind. — 3) Diese Reaktion ist streng spezifisch: sie stellt sich nur dann ein, wenn gleichartige Trypanosomenrassen gemischt werden. — 4) Mittels dieser Reaktion können Ausgangsrassen und Rezidivrassen, wie auch verschiedene Rezidivrassen voneinander unterschieden werden. — 5) Rieckenbergs Phänomen, das auf die Anwesenheit von Schutzanordnungen deutet, kann auch für Untersuchungen über die Immunität bei Trypanosomenerkrankungen ausgenützt werden. — 6) Die Rieckenbergsche Reaktion, die schon geringste Veränderungen der Trypanosomen andeutet, kann zur Feststellung der Veränderungen, denen die Trypanosomen während der Infektion unterliegen, verwendet werden. — 7) Dank ihrer außerordentlich großen Sensibilität ist die RR. hinsichtlich ihrer praktischen Anwendbarkeit einigermaßen beschränkt. — 8) Bei einer Infektion mit dem Stamme Tr. equiperdum „I" (Ausgangsrasse) tritt eine Immunität ein mit einer Zeitdauer von $2^1/_2$—3 Monaten. Diese Immunität gilt nur für die Trypanosomenrasse, welche die primäre Infektion hervorgerufen hat.

Ueber „erzwungene“ Antagonisten.

IV. Mitteilung.

[Reichslaboratorium für Chemie und Bakteriologie. Ukrainisches Rotes Kreuz, Laboratorium des Krankenhauses.]

Von Dr. **Ignaz Schiller**, Odessa.

Die Hefen können, wie wir schon nachgewiesen haben, sehr leicht zu Antagonisten der grampositiven und gramnegativen Bakterien werden[1]). In einem zuckerhaltigen, aber stickstofffreien Milieu werden die Staphylokokken, Typhus-, Paratyphus- und Dysenteriebazillen und die Choleravibrionen lebend verdaut[2]). Dieser Antagonismus kommt dadurch zustande, daß die Hefen auf der Suche nach stickstoffhaltigen Substanzen die lebenden Bakterien angreifen und sie als Nahrung verwenden.

Hier soll der erzwungene Antagonismus der Hefen den Tuberkelbazillen gegenüber behandelt werden.

Die Verdauung der lebenden Tuberkelbazillen durch die Hefen bietet in mancher Hinsicht Interesse.

1) In bezug auf das Auftreten der atypischen Funktion der Hefezellen. Muß doch die Hefe, um Tuberkelbazillen zu verdauen, eine Reihe von Fermenten produzieren, welche unter normalen Verhältnissen niemals zutage treten.

2) Es kommt möglicherweise der Verdauung der lebenden Tuberkelbazillen durch so harmlose Organismen wie die Hefezellen eine praktische Bedeutung zu.

Die Aufgabe, die wir uns hier gestellt haben, ist, zu beweisen, daß die Hefezellen leicht zu erzwungenen Antagonisten der Tuberkelbazillen verwandelt werden können, und daß im Laufe der Verdauung Stoffe ausgeschieden werden, die auch außerhalb der Hefezellen aktiv sind.

Versuch Nr. 1. 2 Agarbierhefenkulturen werden in 2 ccm 2proz. Saccharoselösung emulsioniert und dieser Emulsion 0,1 mg Tuberkelbazillen zugefügt. Nach 48 Std. zeigt sich eine starke Vermehrung der Hefen, wobei heftige Alkoholgärung mit Schaumbildung entsteht. Die Hefen setzen sich zu Boden und bilden einen dicken Niederschlag. Bei ihrer Untersuchung sieht man, daß sie sich in reger Knospung befinden. Die Tuberkelbazillen treten entweder als dünne, schwach gefärbte Fäden, oder als fein granulierte und schwach gefärbte (mit Fuchsin) Gebilde auf[3]), die aber sehr selten sind. Hauptsächlich trifft man blaue Flecken (Methylenblaunachfärbung), die bei sorgfältiger Betrachtung sich als aus feinen Körnchen bestehend nachweisen lassen und die Ueberreste der Tuberkelbazillen sind.

---

1) Schiller, J., Ueber „erzwungene“ Antagonisten. II. Mitteilung. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 92. 1924.) — Ders., Ueber „erzwungene“ Antagonisten, III. Mitteilung (l. c. Bd. 94. 1924.)

2) Unsere Versuche beziehen sich nur auf diese Bakterienarten. Es ist kein Grund, anzunehmen, daß die übrigen grampositiven und gramnegativen Bakterien sich anders verhalten.

3) Färbung nach Ziehl-Neelsen.

Nach 48 Std. hört die Gärung auf. Fügen wir einige Tropfen Bouillon zu, so geht die Gärung wieder vor sich und die Bakterien werden restlos verdaut. (In unserer 1. Mitteilung haben wir die Fähigkeit der kleinen Bouillondosen, die Freßlust der Antagonisten anzuspornen, hervorgehoben).

Ein anderes Verfahren, um die Hefen zu vollständiger Verdauung der Tuberkelbazillen zu veranlassen, besteht darin, daß wir den Hefeniederschlag zusammen mit den Tuberkelbazillen in ein neues Reagenzglas mit 2 ccm 2proz. Saccharoselösung bringen. Es entsteht dann wieder eine starke Gärung, und die Tuberkelbazillen werden zum Verschwinden gebracht.

In unseren Studien über die Verdauung der lebenden grampositiven und gramnegativen Bakterien durch die Hefen[1]) bemerken wir, daß, ungeachtet der Form, in der die Verdauung vor sich geht, (intrazellulär oder extrazellulär), nach vollendeter Vernichtung der Bakterien die auflösenden Substanzen in das Filtrat übergehen.

Wir können dasselbe auch in bezug auf die Verdauung der Tuberkelbazillen sagen.

Versuch Nr. 2. Um das bakteriolytische Vermögen der ausgeschiedenen Substanz nachzuweisen, verfuhren wir folgendermaßen: Nachdem in dem Reagenzglas, welches 2 ccm 2proz. Glykoselösung enthält, die vollständige Vernichtung der Tuberkelbazillen erfolgt ist, wird die Flüssigkeit durch längeres Abzentrifugieren von den Hefen befreit. Wenn wir in derselben eine kleine Quantität (0,01 mg) einer ganz jungen Tuberkelbazillenkultur emulsionieren, so bemerken wir, daß die Auflösung der Bazillen schon nach ungefähr 2 Min. beginnt. Zuerst sieht man die Verwandlung einzelner Bazillen in granulierte Stäbchen. Nach $^1/_2$ Std. sind aber fast alle Stäbchen granuliert. Nach 1—3 Std. bemerkt man schon, daß eine Menge von Tuberkelbazillen aufgelöst ist, was man an den oben erwähnten blauen Flecken sieht, welche die Ueberreste der Bakterien darstellen. Interessant ist die Tatsache, daß der Auflösung der Bakterien eine Art Agglutination vorausgeht, bei der die Bazillen in Haufen von verschiedener Größe zusammengeballt sind. Dieselbe Erscheinung wurde von uns bei der Auflösung anderer Bakterien beschrieben[1]). Nach 8 Std. sind alle Tuberkelbazillen verschwunden.

Als Kontrolle diente eine Tuberkelbazillenemulsion in einer durch dieselbe Quantität von Hefen vergärten 2proz. Zuckerlösung. Die Bazillen blieben unbeschädigt.

Wir glauben, diesen Resultaten eine große Bedeutung beimessen zu können. Soweit aus der Literatur zu ersehen ist, ist die Auflösung der Tuberkelbazillen auf biologischem Wege (durch spezifische Sera) noch niemand gelungen, auch ist die Agglutination in Frage gestellt worden. Die Behauptung verschiedener Autoren, daß sie Auflösung der Bazillen in der Bauchhöhle der behandelten Tiere (Meerschweinchen) erzielt hätten, wird von anderen Forschern für unrichtig gehalten. Calmette konnte nachweisen, daß, wenn sensibilisierte Tuberkelbazillen zusammen mit einem Ueberschuß von Serum Meerschweinchen eingespritzt werden, dieselben früher als die Kontrolltiere zugrunde gehen.

---

1) J. Schiller, l. c. Bd. 92. 1924.

Wir berichteten in unserer 2. Mitteilung[1]), daß, wenn Bakterien der Wirkung der bakteriolytischen Substanz ausgesetzt werden, sie sich entsprechend ihrer Widerstandsfähigkeit in kürzerer oder längerer Zeit auflösen und daß wir diese Tatsache benutzten, um resistente Rassen zu gewinnen. Wenn die Hefen veranlaßt werden, solche resistenten Bakterien zu verdauen, so müssen sie in verstärktem Maße die auflösende Substanz ausscheiden. In der Tat bemerkten wir bei der Prüfung der Wirkung solcher bakteriolytischen Substanzen auf die Verdauung natürlicher (nicht resistenter) Stämme eine viel raschere Auflösung der Bakterien. Dasselbe gilt auch für die Tuberkelbazillen. Wir sind jetzt bemüht, solche bakteriolytische Substanzen herzustellen, welche imstande wären, normale Tuberkelbazillen in kürzester Zeit (in Minuten) restlos aufzulösen. Ueber die Resultate werden wir demnächst berichten.

Die bakteriolytische Substanz, welche von den Hefen ausgeschieden wird, ist thermolabil und wird bei 58°—68° C zerstört.

Da die Auflösung der Tuberkelbazillen an das Vorhandensein eines wachslösenden Fermentes gebunden ist, so untersuchten wir, ob die bakteriolytische Substanz auf Bienenwachs einwirkte.

Die Versuche wurden in Petrischalen ausgeführt. Die bakteriolytische Substanz wurde auf die Wachsoberfläche gebracht und verblieb da 24 Std. bei 37° C. Nach dieser Zeit konnnten wir auf der Wachsfläche merkliche Veränderungen beobachten: es entstanden kleine Löcher, welche die glatte Oberfläche in eine rauhe verwandelten, und bildeten sich größere Vertiefungen.

Zusammenfassung der Resultate.

1. Wenn Bierhefen sich zusammen mit Tuberkelbazillen in einem zuckerhaltigen, aber stickstofffreien Milieu befinden, so werden sie zu Antagonisten der letzteren. — 2. Die Verdauung der lebenden Tuberkelbazillen erfolgt durch Ausscheidung einer bakteriolytischen Substanz. — 3. Diese letztere wirkt auch außerhalb der Hefen. — 4. Die Verdauung der resistenten Bakterienrassen erfolgt durch Ausscheidung einer mehr aktiven bakteriolytischen Substanz. — 5. Die bakteriolytische Substanz wirkt auf das Bienenwachs auflösend.

Ueber die Existenz der zellulären Anaphylaxie. I. Aktive zelluläre Anaphylaxie bei Hunden.

[Aus dem Mikrobiologischen Institut an der Moskauer Medizinischen Hochschule (II. Staatsuniversität) und aus dem Laboratorium des Reichs-Anilintrustes (Direktor: Prof. I. L. Kritschewsky).]

Von Prof. Dr. **I. L. Kritschewsky** und Dr. **K. A. Friede**.

Die vorliegende Arbeit bezweckt die Klärung der Frage, ob eine zelluläre Anaphylaxie tatsächlich existiert.

1) Schiller, l. c. Bd. 92. 1924. S. 128.

Friedemann[1]) hat als erster eine zelluläre Anaphylaxie bei Kaninchen erzeugt (Antigen-Ochsenerythrozyten), und zwar sowohl eine aktive wie auch eine passive homologe Anaphylaxie. Bei aktiver Anaphylaxie wird schon 6 Tage nach der ersten Immunisierung (Sensibilisierung) die Prüfungsinjektion von einem Schock begleitet, der hierbei allerdings nur selten zum Tode führt. Nach zweimaliger Sensibilisierung tritt dagegen nach der Prüfungsinjektion fast immer der Tod ein.

Bei zellulärer Anaphylaxie tritt keine Antianaphylaxie auf. Die passive zelluläre Anaphylaxie bei Kaninchen unterscheidet sich von der Serumanaphylaxie bei Meerschweinchen dadurch, daß sie bei gleichzeitiger intravenöser Einführung der Mischung: Erythrozyten + homologes hämolytisches Kaninchenserum besonders scharf ausgedrückt wird; sie ist auch dann zu beobachten, wenn Antigen und Antikörper getrennt — gleichzeitig oder nach einem geringen Zeitintervall — in verschiedene Ohrvenen eingeführt werden. Wird das Immunserum dem Kaninchen einige Stunden oder einen Tag nach der Antigeneinführung eingespritzt, dann sind die Symptome weit weniger charakteristisch.

Thomsen[2]) gibt an, bei Meerschweinchen eine aktive zelluläre Anaphylaxie gegen Erythrozyten verschiedener Tierarten erzeugt zu haben. Bei der Sensibilisierung und bei der Probe hat er keine nativen Erythrozyten gebraucht, sondern solche, die in Aq. dest. hämolysiert und deren Lösung durch Zusatz von NaCl isotonisch gemacht worden waren. Von großem Interesse ist die Tatsache, daß bei solchem Verfahren die Meerschweinchen bei der Prüfung mit einem heterogenetischen Antigen mit anaphylaktischen Symptomen reagierten; es wurden manchmal bei der Sensibilisierung und bei der Probe solche Antigene verwendet, die zueinander artfremd waren (z. B. Pferd — Huhn; Huhn — Mensch und umgekehrt Ziege — Taube). Zweimal war nun solche heterogenetische Anaphylaxie von sehr schweren Symptomen begleitet, wobei in einem Falle (Ziege — Taube) das Versuchstier nach 44 Minuten verendet ist.

Bei der Sensibilisierung mit nativen, nicht hämolysierten, Erythrozyten und auch bei der Probe mit solchen Erythrozyten hat Thomsen keine Anaphylaxie bei Meerschweinchen beobachtet.

Thomsen bezweifelt, daß die Erkrankung und der Tod der Kaninchen in den Versuchen Friedemanns wirklich durch Anaphylaxie bedingt gewesen seien, weil Friedemann die Identität der anaphylaktischen Antikörper mit dem hämolytischen Ambozeptor selbst anerkannt hat, und weil die beobachtete Erscheinung durch die von Coca[3]) in dergleichen Fällen konstatierte Verstopfung der kleinen Blutgefäße durch agglutinierte Erythrozyten erklärt werden kann. Thomsen schreibt den anaphylaxieähnlichen Symptomen eine derartige anatomische Basis zu, die von der des anaphylaktischen Schocks gänzlich differiert, es muß deshalb seiner Ansicht nach, „als sehr unsicher gelten, ob die Erscheinungen mit der wirklichen Anaphylaxie in Verbindung stehen.“

Die bei seiner Versuchsanordnung eintretende Anaphylaxie hält Thomsen für eine zelluläre Anaphylaxie gegen Erythrozyten, und zwar aus folgenden Gründen: 1) die Meerschweinchen werden, wie bei der Serumanaphylaxie, nach Einführung kleiner Antigendosen (0,01 ccm) überempfindlich, 2) nach einem überstandenen Schock tritt der Zustand einer Antianaphylaxie ein, gleich dem bei Serumanaphylaxie, 3) bei den nach seiner Methode sensibilisierten Meerschweinchen wurden weder Hämolysine noch Agglutinine gegen das entsprechende Antigen (Pferde-, Hammel- oder Menschenerythrozyten) nachgewiesen.

Doerr und Moldovan[4]) haben bei Meerschweinchen eine passive zelluläre Anaphylaxie mit letalem Exitus erhalten, wenn sie dieselben mit 1,5 ccm Antihammelkaninchenserum (Titer 0,001) intraperitoneal sensibilisierten und nach 24 Stunden abnehmende Erythrozytenmengen (Probe von 1 ccm bis 0,02 ccm 50proz. Aufschwemmung) injizierten.

Eine gleichzeitige Einführung von Erythrozyten in die V. jugularis und von einem Immunserum in die andere, oder die Einführung einer Mischung derselben wird bei Meerschweinchen von keinem anaphylaktischen Schock begleitet.

Doerr und Moldovan haben auch eine Antianaphylaxie beobachtet, die nach überstandenem Schock eintritt.

So haben z. B. Meerschweinchen, die sich nach der Probe mit Erythrozyten erholt hatten (Nr. 814: 0,01, sehr schwere Erscheinungen, hat sich erholt; Nr. 815: 0,005, schwere Erscheinungen; Nr. 816: 0,002, schwere Erscheinungen) am folgenden Tage zwei letale Dosen Erythrozyten (0,04) erhalten; dabei sind bei Nr. 814 sehr

1) Friedemann, Ztschr. f. Immunitätsf. Bd. 2.
2) Thomsen, ebenda. Bd. 3.
3) Coca, Virchows Arch. Bd. 196.
4) Doerr u. Moldovan, Ztschr. f. Immunitätsf. Bd. 4.

schwere Erscheinungen, bei Nr. 815 keine bestimmten Erscheinungen und bei Nr. 816 schwere Erscheinungen konstatiert worden.

Die Autoren schreiben dem Phänomen der Antianaphylaxie eine besonders große Bedeutung zu, weil Kraus nur infolge des Ausbleibens einer Antianaphylaxie bei Kaninchen nach einer Erythrozytenprobe die Existenz einer zellulären Anaphylaxie in den Versuchen Friedemanns bestreitet. Die Autoren selbst sind zwar derselben Meinung wie Friedemann, nämlich, daß das Ausbleiben der Antianaphylaxie nach einem Shock keineswegs zu einem Zweifel an der Existenz einer zellulären Anaphylaxie Veranlassung geben könne, da bei Kaninchen ebenfalls keine Serumantianaphylaxie eintritt.

Etwas später hat Doerr in einer gemeinsamen Arbeit mit Pick[1]), ohne seine Protokolle anzugeben, berichtet, daß es ihm weiterhin nicht gelungen sei, Meerschweinchen gegen Hammelerythrozyten zu sensibilisieren, obwohl die Meerschweinchen große Mengen eines sehr aktiven Immunserums intraperitoneal und auch hohe Dosen Antigen intravenös erhielten. Die Autoren geben der Tatsache, daß diese Versuche mit den vorhergehenden nicht gleich sind, folgende Erklärung: Die Fähigkeit der Meerschweinchenorgane, die Antikörper gegen Hammelerythrozyten zu binden, sei höchst ungleich und könne sich in einem Versuch stärker, in einem anderen Versuch schwächer äußern. Wenn wir die Autoren richtig verstehen, bestreiten sie die Möglichkeit einer passiven Sensibilisierung der Tiere auf Grund des Vorhandenseins einer festen Verbindung der Organe mit den eingeführten Antikörpern; das Entstehen einer solchen Verbindung kann durch die Abwesenheit von Hämolysinen in Blut und Bauchhöhle konstatiert werden.

Schiff und Moore[2]) haben, im Gegensatz zu Doerr und Moldovan, Meerschweinchen gegen Hammelerythrozyten passiv nicht sensibilisieren können, obgleich das Immunserum teils sehr hochwertig war und die Probe mit 0,5 und 1,0 ccm sedimentierter Erythrozyten ausgeführt wurde.

Jedoch ist es den Autoren gelungen, eine aktive zelluläre Anaphylaxie (mit Hammel-, Ochsen- und Menschenerythrozyten) bei Meerschweinchen zu erzeugen; dabei sind von 30 Meerschweinchen, die mit Hammelerythrozyten sensibilisiert worden waren, drei gestorben; von 14 mit Menschenerythrozyten sensibilisierten Meerschweinchen gleichfalls drei.

Schiff und Moore sind zu dem Schluß gekommen, daß bei Meerschweinchen eine zelluläre Anaphylaxie wohl erzeugt werden kann, jedoch viel seltener, als die sich stets regelmäßig einstellende Serumanaphylaxie; sie konstatieren eine Analogie in dieser Hinsicht mit der Serumanaphylaxie bei Mäusen, Hunden und Kaninchen. Sie weisen darauf hin, daß die von ihnen bei Meerschweinchen erzeugte aktive Anaphylaxie gegen Hammelerythrozyten die Meinung Doerrs umstürzt, nach der bei dieser Tierart infolge der Anwesenheit eines mit Hammelerythrozyten identischen Antigens (Forssman) in den Organen keine passive zelluläre Anaphylaxie eintreten kann.

Bezüglich der Arbeit Friedemanns[3]) machen Schiff und Moore den Einwand, daß 1) die Möglichkeit nicht ausgeschlossen ist, daß der Schock bei den Kaninchen durch Serumanaphylaxie verursacht gewesen sei[3]) (die Verfasser haben bei ihren Versuchen die Erythrozyten 10mal mit 50fachem Volumen physiolog. Kochsalzlösung gewaschen), daß 2) keine Antianaphylaxie stattgefunden hat, und daß 3) die passive Anaphylaxie nur bei gleichzeitiger Einführung von Antigen und Antikörper erzeugt worden ist.

Thiele u. Embleton[4]) haben Meerschweinchen mit einem homologen Antihammelerythrozyten-, Kaninchen- oder Meerschweinchenserum präpariert und alsdann nach 48 Std. eine Probe mit intravenöser Einführung von 6 ccm 10proz. Aufschwemmung von Hammelerythrozyten angestellt. Jedesmal, wenn die Quantität der eingeführten hämolytischen IE. genügend war, haben die Autoren einen Schock (22 Fälle) und meistens auch den Tod der Tiere (15 Fälle) konstatiert. Die Verfasser haben dabei gezeigt, daß bei Meerschweinchen eine passive zelluläre Anaphylaxie auch ohne Inkubationsperiode erzielt werden kann (intravenöse Sensibilisierung mit 2500—3000 IE. enthaltendem hämolytischen Serum; Probe mit 0,6 ccm 10proz. Erythrozytenaufschwemmung, ebenfalls intravenös), wenn zwischen Sensibilisierung und Probe nicht über 10 Min. vergangen sind.

Neuerdings hat Doerr[5]) einen ganz neuen Gesichtspunkt angenommen. Be-

1) Doerr u. Pick, Biochem. Ztschr. Bd. 50.
2) Schiff u. Moore, Ztschr. f. Immunitätsf. Bd. 22.
3) Friedemann berichtet nicht, wievielmal er die Erythrozyten gewaschen hat.
4) Thiele u. Embleton, Ztschr. f. Immunitätsf. Bd. 20.
5) Doerr, Weichardts Ergebnisse. Bd. 1.

züglich der oben zitierten Untersuchungen der englischen Verfasser hat er folgendes geäußert: „.... und dieser Umstand allein würde genügen, um Zweifel an den Schlüssen dieser Autoren zu erwecken; eine Hämolyse in der Blutbahn, eine Hämagglutination können schwere Symptome und Exitus erzeugen, auch wenn keine Anaphylaxie vorliegt, wie etwa bei der Vergiftung mit Toluylendiamin.“

Die oben angegebenen Untersuchungen der Autoren, die sich mit dieser Frage befaßt haben, zeigen, daß die Existenz einer zellulären Anaphylaxie bei Kaninchen bestritten wird, sogar wenn alle zur Erzielung einer Ueberempfindlichkeit (Sensibilisierung oder Präparierung mit einem Immunserum und „Probe“ mit demselben Antigen) erforderlichen Momente und der gewöhnliche anaphylaktische Symptomenkomplex vorhanden sind.

Thomsen und Doerr glauben, daß, auch wenn alle für das Erzeugen der Anaphylaxie notwendigen Bedingungen erfüllt sind und ein mit dem anaphylaktischen Schock identischer Symptomenkomplex vorliegt, trotzdem nach Sensibilisierung und nach Prüfung mit Erythrozyten bei Kaninchen kein anaphylaktischer Prozeß stattfindet. Thomsen ist der Ansicht, daß der ganze Symptomenkomplex durch eine Verstopfung der Kapillargefäße durch agglutinierte Erythrozyten verursacht wird, während Doerr die Ursache der anaphylaktischen Symptome sowohl in der Agglutination der Erythrozyten, wie auch in der Hämolyse sieht; er identifiziert die Pathogenese des Prozesses mit der Pathogenese der Vergiftung mit Toluylendiamin.

Von unserem Standpunkt aus erscheint eine derartige Stellungnahme unbegründet, selbst wenn bei Erythrozytenanaphylaxie tatsächlich Agglutination oder Hämolyse stattfindet, da diese nur eine der Ausdrucksformen der Störung des Dispersionsgrades der Kolloide im Organismus darstellt[1] [2], die ja das Wesen jedes anaphylaktischen Schocks, sogar des klassischen Schocks, bei der Serumanaphylaxie der Meerschweinchen ist. Es sind auch bei Erythrozytenanaphylaxie, wie auch bei Serumanaphylaxie, eine vorherige Sensibilisierung des Organismus, die Anwesenheit von Immunkörpern und eine Probe mit einem homologen Antigen notwendig. Ohne uns mit der Frage über die Einheit oder Vielheit der Antikörper zu befassen, müssen wir das unbegründete Argument bestreiten, auf welches Thomsen seine Ansicht basiert hat, nämlich, daß die von Friedemann anerkannte Identität der Hämolysine mit den anaphylaktischen Antikörpern die Ansicht des dänischen Verfassers bestätige, nach der das als zelluläre Anaphylaxie betrachtete Phänomen durch eine Verstopfung der Blutgefäße mit Erythrozytenthromben verursacht sei. Tritt man dieser Anschauung bei, dann muß man gleichfalls annehmen, daß es auch keine Serumanaphylaxie gibt, weil ja infolge der Anwesenheit von Präzipitinen bei Eiweißsensibilisierung dieses Phänomen der Wirkung der Präzipitine zugeschrieben werden müßte.

Es sind auch, wie Sleswijk, Tscharnotzky und Kumagai gezeigt haben, hämolytische Prozesse bei der Serumanaphylaxie der Meerschweinchen oft vorhanden, es wird jedoch niemand wegen der Anwesenheit solcher Prozesse behaupten, daß dieses Phänomen nicht anaphylaktischer Natur sei.

1) Kritschewsky u. Friede, Ueber die Pathogenese des anaphylaktischen Shocks, der ihm ähnlichen und verwandten Prozesse. (Ztschr. f. Immunitätsf. Bd. 43.)

2) Kritschewsky, Zur Auffassung des anaphylaktischen Schocks als eines physikalisch-chemischen Phänomens. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 92.)

Der zweite Grund, weshalb die Existenz einer zellulären Anaphylaxie[1]) bei Kaninchen bestritten wurde, war die Vermutung, daß die sog. Erythrozytenanaphylaxie tatsächlich nichts anderes als eine Serumanaphylaxie sei (Schiff und Moore). Sogar angenommen, daß Friedemann die Erythrozyten schlecht gewaschen hätte, kann solcher Vermutung doch kein Glauben geschenkt werden, da bei Serumanaphylaxie der Kaninchen ein klinisch ausgeprägter anaphylaktischer Schock und der Tod nur sehr selten und mit großer Schwierigkeit erhalten werden können, bei den Versuchen Friedemanns dagegen das Phänomen ständig eingetreten ist. Außerdem sprechen die Untersuchungsergebnisse des einen von uns[2]) dafür, daß die Anaphylaxie in den Versuchen Friedemanns wirklich erythrozytärer Natur gewesen ist. Diese Versuche sind derart angestellt worden, daß jede Möglichkeit einer gegenseitigen Wirkung zwischen den Serumspuren, die an den Erythrozyten hafteten, und den entsprechenden Antikörpern ausgeschlossen war (heterogenetische zelluläre Anaphylaxie: Sensibilisierung mit Hühnererythrozyten, Probe mit Hammelerythrozyten).

Wenn man die oben angeführten kritischen Bemerkungen bezüglich der Möglichkeit, eine zelluläre Anaphylaxie zu erzeugen, analysiert, fällt einem die Tatsache auf, daß mehrere Autoren, die sich mit dieser Frage befaßt haben, auffällige Forderungen stellen und bei der zellulären Anaphylaxie der Kaninchen die gleichen Erscheinungen sehen wollen, wie sie bei der Serumanaphylaxie der Meerschweinchen eintreten. Diese Autoren vergessen, daß zwischen den Organismen dieser Tiere, die zu verschiedenen Tierarten gehören, große Differenzen bestehen, daß sie folglich auf die Injektion irgendeines Giftes mit ganz verschiedenen Prozessen reagieren müssen, und daß auch bei der Serumanaphylaxie der Kaninchen die typischen Phänomene ausbleiben, trotzdem wird die Möglichkeit des Eintretens einer Serumanaphylaxie bei dieser Tierart von niemand bestritten werden (Arthus).

Thomsen will die zelluläre Anaphylaxie nur in dem Falle als ein reales Phänomen anerkennen, wenn die Kaninchen durch kleine Dosen Erythrozyten sensibilisiert werden könnten, wenn sie nach einem überstandenen Schock antianaphylaktisch sein würden und wenn sie keine Hämolysine und Hämagglutinine produzieren würden. Kraus stellt ebenfalls die Forderung, daß bei den Kaninchen nach einem überlebten Schock eine Antianaphylaxie eintreten müßte. Schiff und Moore verlangen, daß die passive Anaphylaxie bei dieser Tierart unter denselben Bedingungen, wie bei Meerschweinchen verlaufen solle; sonst können sie eine zelluläre Anaphylaxie nicht anerkennen.

Thomsen vergißt indes, daß die Kaninchen, sogar wenn sie öfters mit hohen Eiweißdosen sensibilisiert werden, nur selten die Fähigkeit erhalten, auf eine Probe mit einem zum Tode führenden anaphylaktischen Schock zu reagieren. Es wird dabei auch der Umstand außer Acht gelassen, daß die Kaninchen nur mit größter Schwierigkeit durch unorganisiertes Eiweiß passiv sensibilisiert werden können (mehrmalige passive Sensibilisierung), und daß die Anaphylaxie bei ihnen meistens nur durch verminderten Blutdruck und gesteigerte Atmung[3]) ausgedrückt wird. Es wird ebenfalls außer Acht gelassen, daß ein Kaninchen auch nach überstandener Serumanaphylaxie nicht antianaphylaktisch wird. Be-

1) Zwar nur bezüglich der Untersuchung Friedemanns an Kaninchen.
2) Kritschewsky, Heterogeneous anaphylaxis. (Journ. of Inf. Dis. Vol. 32.)
3) Arthus, De l'anaphylaxie à l'immunité. Paris (Masson & Co.) 1921.

sonders fällt uns auf, daß Thomsen, der einen anaphylaktischen Schock bei Kaninchen zu erzeugen sucht, die Antikörper (Hämolysine, Hämagglutinine), welche bei der Immunisierung mit ungeschädigten Erythrozyten allein entstehen können, in vitro nicht konstatieren will.

Selbstverständlich kann die Anaphylaxie bei Kaninchen in keinem Falle, ob dieselben mit Serum oder mit Zellenelementen sensibilisiert seien, ebenso wie bei Meerschweinchen verlaufen.

Bei solcher Sachlage bezüglich der zellulären Anaphylaxie bei Kaninchen erschien es zweckmäßig, die Frage an Meerschweinchen zu klären, d. h. an jenem Tier, welches als Standardtier bei der Untersuchung aller anaphylaktischen Erscheinungen benutzt wird. Wenn wir auch zugeben, daß die Untersuchung dieses Prozesses an Meerschweinchen einen Widerspruch darstellt, so ist nicht zu leugnen, daß auf diese Weise mehrere höchst wertvolle Tatsachen festgestellt worden sind.

Es steht außer Zweifel, daß Schiff und Moore eine aktive Anaphylaxie gegen Erythrozyten bei Meerschweinchen erzeugt haben. Bezüglich Thomsens Arbeit muß festgestellt werden, daß der Autor einen Fehler begangen hat, wenn er eine Eiweißanaphylaxie, die durch Sensibilisierung und Probe mit Hämoglobin verursacht worden war, für eine Erythrozytenanaphylaxie angesehen hat.

Thiele und Embleton haben gezeigt, daß Meerschweinchen auch passiv gegen Erythrozyten sensibilisiert werden können, und zwar unter denselben Bedingungen, wie bei passiver Serumanaphylaxie, d. h. wenn die „Probe" nach einem gewissen Zeitraum nach der Einführung des Immunserums stattfindet.

Doerr und Moldovan glauben, daß die Meerschweinchen, nachdem sie einen Schock bei der „Probe" ertragen haben, antianaphylaktisch werden.

Eine aktive oder passive Sensibilisierung der Meerschweinchen gegen Erythrozyten kann jedoch nicht immer erzeugt werden; dasselbe kann in noch größerem Maße über die zelluläre Antianaphylaxie bei derselben Tierart gesagt werden.

So führen Schiff und Moore selbst bezüglich der Möglichkeit, Meerschweinchen aktiv gegen Erythrozyten zu sensibilisieren, den Nachweis, daß dieses Phänomen nur sehr selten und unbeständig stattfindet.

Dasselbe kann um so eher bezüglich der passiven Sensibilisierung gesagt werden; während es Thiele und Embleton vollkommen gelungen ist, eine solche zu erzeugen, haben Schiff und Moore dagegen, die ebenfalls hochwertige Sera gebrauchten, nicht vermocht, eine passive Sensibilisierung durchzuführen. Doerr hat in manchen Versuchen (mit Moldovan) eine passive Anaphylaxie erzeugt, dann wieder ein negatives Resultat erhalten (mit Pick).

Was die Antianaphylaxie betrifft, welche Doerr u. Moldovan nach ihrer Ansicht erzeugt haben, so erlauben uns ihre Versuche ein Urteil hierüber nicht, da das Material, das die Verfasser angegeben haben, nicht als überzeugend genug betrachtet werden kann.

Obwohl wir vollkommen überzeugt waren, daß eine zelluläre Anaphylaxie tatsächlich stattfindet, und daß bei dem Erzeugen derselben das Kaninchen vielleicht eben solch ein Testobjekt darstellt, wie das Meerschweinchen bei der Serumanaphylaxie, hielten wir es doch infolge der Widersprüche, welche zwischen den Ansichten verschiedener Verfasser bestehen, für nützlich, die Frage genauer zu klären, indem wir

das Verhalten des Hundeorganismus in dieser Hinsicht untersuchten[1]).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob bei Hunden aktive Anaphylaxie gegen Erythrozyten erzeugt werden kann. In einer II. Mitteilung wird über passive zelluläre Anaphylaxie und über Antianaphylaxie bei derselben Tierart berichtet werden.

Protokolle.

Hund Nr. 1, 6000 g. Immunisierung: 21. 3.: 4 ccm (sedimentierter) Hammelerythrozyten in die Ohrvene[2]); 28. 3.: 7,5 ccm Hammelerythrozyten i.v.; 15. 4.: 7,5 ccm Hammelerythrozyten i.v.; 22. 4.: 6 ccm Erythrozyten i.v.

Bestimmung des hämolytischen Serumtiters[3]).

5. 4.	Nach 1 Std.	Nach 2 Std.
0,02	komplette Hämolyse	komplette Hämolyse
0,01	„ „	„ „
0,002	„ „	„ „
0,001	inkomplette Hämolyse	fast komplette Hämolyse
0,0005	keine Hämolyse	keine Hämolyse

Die klinischen Symptome bei der Immunisierung.

5. 4.: Unmittelbar nach der intravenösen Injektion von 7,5 ccm Erythrozyten stellten sich, während das Tier noch an den Operationstisch gebunden war, Brechbewegungen ein, die $2^1/_2$ Min. anhielten. Die Brechbewegungen waren anfangs von Erbrechen begleitet (3mal). In den Intervallen zwischen zwei Brechbewegungen hustete das Tier mit großer Anstrengung.

3 Min. nach der Injektion, als das Erbrechen schon aufgehört hatte, gingen Urin und Fäzes ab; bald darauf noch zwei diarrhoische Stuhlentleerungen, die kurze Zeit nacheinander folgten. Nach $1^1/_2$ Min. hörten die Erscheinungen auf, worauf sich das Tier erholte.

Am 15. 4. und 22. 4. trat kein Schock ein. Der Hund wurde aus dem Versuch entlassen.

---

1) Das Kaninchen und das Meerschweinchen stellen unserer Ansicht nach bei aktiver und passiver Sensibilisierung einen vollen Kontrast dar.

Für die Aeußerung der zellulären Anaphylaxie ist die Anwesenheit von Immunkörpern im Blutkreis erforderlich, infolgedessen sind die für das Entstehen derselben nötigen Momente nicht im Meerschweinchenorganismus, sondern beim Kaninchen vorhanden, da die letztere Tierart im Gegensatz zu dem Meerschweinchen solche Antikörper in großer Menge produziert, und auch weil die Antikörper, sowohl die im Organismus produzierten, wie auch die von außen eingeführten, von den Zellen des Organismus fast gar nicht adsorbiert werden.

Bei Eiweißanaphylaxie spielen dagegen die im Blutkreis vorhandenen Antikörper die Rolle eines antagonistischen Faktors; deshalb tritt die Serumanaphylaxie am beständigsten ein und ist am schärfsten ausgedrückt bei den Meerschweinchen, bei denen nur eine geringe Menge von Antikörpern in den Blutkreis gelangt und die von außen eingeführten Antikörper bald durch die Zellen adsorbiert werden.

Der Hund nimmt wie in der einen so auch in der anderen Hinsicht eine Zwischenstellung ein, wie es aus den Untersuchungen über die Eiweißanaphylaxie bei dieser Tierart bekannt ist und wie es sich aus den unten angegebenen Tatsachen bezüglich der Erythrozytenanaphylaxie ergibt.

2) In allen Versuchen wurden die Erythrozyten 7mal gewaschen. Vor der Injektion wurden die sedimentierten Erythrozyten mit einem gleichen Volumen physiol. Kochsalzlösung verdünnt.

3) Der Versuch wurde im Volumen 1,5 ccm Flüssigkeit angestellt (0,5 ccm des zu bestimmenden Serum, 0,5 ccm 5proz. Erythrozytenaufschwemmung, 0,5 ccm Meerschweinchenkomplement 1:10).

Hund Nr. 2, 16000 g. Immunisierung: 21. 8: 6,75 ccm Hammelerythrozyten in die Ohrvene; 5. 4.: 6 ccm Hammelerythrozyten i.v.; 22. 4.: 6 ccm Hammelerythrozyten i.v.

Bestimmung des hämolytischen Serumtiters.

5. 5.	Nach 1 Std.	Nach 2 Std.
0,02	inkomplette Hämolyse	inkomplette Hämolyse
0,01	" "	" "
0,002	schwache "	schwache "
0,001	keine "	keine "

Die klinischen Erscheinungen bei der Immunisierung.

5. 4.: Nach intravenöser Injektion von 6 ccm Hammelerythrozyten Abgehen von Urin und zweimalige Defäkation (geformter Stuhl). 5 Min. nach der Injektion: Parese der Hinterpfoten, infolge deren das Tier, wenn es zum Gehen gezwungen wurde, wie betrunken wackelte. 22. 4.: kein Schock. Aus dem Versuch entlassen.

Hund Nr. 3, 6000 g. Immunisierung: 8. 4.: 3 ccm Hammelerythrozyten i.v.; 22. 4.: 5 ccm Erythrozyten i.v.; 1. 5.: †.

Klinische Erscheinungen.

22. 4.: Nach der intravenösen Injektion von Erythrozyten scharf ausgedrückte Manegebewegungen, die 50 Sek. anhielten. Alsdann erholte sich das Tier.

Hund Nr. 4, 2200 g. Immunisierung: 12. 5.: 4 ccm Hammelerythrozyten i.v.; 19. 5.: 5 ccm sedimentierter Erythrozyten i.v.; 23. 5.: †.

Klinische Erscheinungen.

19. 5.: Sofort nach der Erythrozyteninjektion starkes Erbrechen und Durchfall. Gleichzeitig scharf ausgesprochene Parese der Extremitäten während 5 Min. Alsdann Tenesmen während $1^1/_2$ Min.; $6^1/_2$ Min. nach der Injektion hörten alle Erscheinungen auf, wonach das Tier sich erholte.

Hund Nr. 5, 2000 g. Immunisierung: 26. 5.: 3 ccm Hammelerythrozyten i.v.; 2. 6.: 3 ccm Erythrozyten i.v.; 8. 6.: 4 ccm Erythrozyten i.v.; 15. 6.: †.

Bestimmung des hämolytischen Serumtiters.

8. 6.	Nach 1 Std.	Nach 2 Std.
0,01	komplette Hämolyse	komplette Hämolyse
0,004	" "	" "
0,002	" "	" "
0,0013	" "	" "
0,001	" "	" "
0,0004	" "	" "
0,0002	fast komplette Hämolyse	" "

Klinische Erscheinungen sind 2mal eingetreten:

1) 2. 6.: Sofort nach der Injektion deutlich ausgesprochene Lähmung der Extremitäten; das Tier fiel auf die Seite und konnte nicht aufstehen. Nach 3 Min. stand der Hund auf, taumelte jedoch bei jeder Bewegung wie betrunken infolge der noch dauernden Parese der Extremitäten. Zu derselben Zeit (4 Min. nach der Injektion) starkes Erbrechen. Die Parese der Extremitäten war eher einer Lähmung

ähnlich, da das Tier bei jedem Versuch zu gehen hinfiel, sich zu erheben suchte und wieder hinfiel. 8 Min. nach der Injektion starke Dyspnoe. Allmählich erholte sich das Tier und war nach 14 Min. vollkommen gesund.

2) 8. 6.: Sofort nach der Injektion von Erythrozyten reichliches Erbrechen, das sich während 10 Min. vielfach wiederholte. Scharf ausgesprochene Parese der Extremitäten.

Hund Nr. 6, 8800 g. Immunisierung: 9. 6.: 4,5 ccm Hammelerythrozyten i.v.; 8. 6.: 5 ccm Erythrozyten i.v.; 16. 6.: 5 ccm Erythrozyten i.v. Aus dem Versuch entlassen.

Bestimmung des hämolytischen Serumtiters.

16. 6.	Nach 1 Std.
0,01	komplette Hämolyse
0,004	„ „
0,002	„ „
0,0004	„ „
0,0002	schwache „

Klinische Erscheinungen sind 2mal eingetreten:

1) 8. 6.: Sofort nach der Injektion von Erythrozyten starke tonische und klonische Krämpfe, das Tier fiel auf die Seite mit einem lauten Schrei. Die Krämpfe dauerten 1 Min. Alsdann Durchfall; nachdem die Krämpfe vergangen, trat Lähmung der Extremitäten ein; das Tier nahm die Lage eines Seehundes an. Nach 12 Min. ist anstatt der Lähmung allmählich eine Parese eingetreten. Nach 20 Min. waren die Bewegungen wieder normal.

2) 16. 6.: Sofort nach der Injektion von Erythrozyten fiel das Tier auf die Seite mit einem lauten Schrei. Starke Krämpfe. Pupillenerweiterung und Exophthalmus. Stark ausgesprochene Brechbewegungen. Nach 3 Min. sind die Erscheinungen vergangen. Das Tier wackelte einige Minuten beim Gehen, war aber nach 12 Min. vollkommen gesund. 22. 6.: †.

Hund Nr. 7, 5600 g. Immunisierung: 9. 6.: 5 ccm Hammelerythrozyten i.v.; 16. 6.: desgl.; 23. 6.: 7 ccm Erythrozyten i.v. Aus dem Versuch entlassen.

Bestimmung des hämolytischen Serumtiters.

23. 6.	Nach 1 Std.	Nach 2 Std.
0,01	komplette Hämolyse	komplette Hämolyse
0,004	„ „	„ „
0,002	„ „	„ „
0,0012	„ „	„ „
0,001	unkomplette „	„ „
0,0004	„ „	„ „
0,0002	„ „	fast komplette Hämolyse

Klinische Erscheinungen sind 2mal beobachtet worden:

1) 16. 6.: Sofort nach der Injektion fiel das Tier auf die Seite mit einem lauten Schrei. Starke Krämpfe, Erbrechen und Abgehen von Urin und Fäzes. Gleichzeitig Pupillenerweiterung, Exophthalmus und starke Salivation während einer Minute. In den Intervallen zwischen den Krämpfen wurde eine Kontraktur der Flexoren an den Extremitäten beobachtet. Nach 3 Min. waren die Krämpfe vergangen, jedoch

dauerte die Lähmung der Pfoten noch 2 Min. Erst nach 5 Min. konnte das Tier aufstehen; wackelnder Gang. Nach 16 Min. gesund.

2) 23. 6.: Sofort nach der Injektion der Erythrozyten fiel das Tier auf die Seite mit einem gellenden Schrei. Starke Krämpfe während 3 Min., wonach starkes Erbrechen eintrat. Wackelnder Gang während $1^1/_2$ Min., alsdann hat sich das Tier vollkommen erholt.

Hund Nr. 8, 3000 g. Immunisierung: 2. 6.: 2,5 ccm Hammelerythrozyten; 9. 6.: 3 ccm Erythrozyten i.p. und 1 ccm in die Ohrvene; 15. 6.: 5 ccm Erythrozyten i.v. Aus dem Versuch entlassen.

Bestimmung des hämolytischen Serumtiters.

15. 6.	Nach 1 Std.
0,01	komplette Hämolyse
0,004	" "
0,002	" "
0,013	" "
0,001	schwache "
0,0004	keine "

Klinische Erscheinungen.

Einige Sekunden nach der Injektion von Erythrozyten fiel das Tier auf die Seite mit einem lauten Schrei und schlug sich in Krämpfen (klonische und tonische Krämpfe); Exophthalmus; Abgang von Urin und Fäzes. Nach 1 Min. hörten diese Erscheinungen auf, während wackelnde Bewegungen noch 28 Min. anhielten.

Hund Nr. 9, 3000 g. Immunisierung: 9. 11.: 2 ccm Hammelerythrozyten i.p.; 17. 11.: 1,5 ccm Erythrozyten i.v.; 21. 11.: †.

Bestimmung des hämolytischen Serumtiters.

17. 11.	Nach 1 Std.
0,01	komplette Hämolyse
0,005	" "
0,002	fast komplette Hämolyse
0,0014	" " "
0,001	schwache Hämolyse
0,0006	keine "

Klinische Erscheinungen.

17. 11.: Sofort nach Injektion der Erythrozyten ein lauter Schrei, das Tier fiel auf die Seite. Starke Krämpfe. Nach 2 Min. hörten die Krämpfe auf, der Hund erhob sich, wackelte aber beim Gehen. Starke Brechbewegungen, denen starkes Erbrechen folgte. Nach 14 Min. war das Tier gesund.

Tabelle I.

Nr. der Tiere	Hämolytischer Titer (komplette Hämolyse)	Hämolytischer Titer (fast komplette Hämolyse)	Resultat der Probe
1	0,002	0,001	Anaphylaktischer Schock
2	—	0,02	dgl.
3	—	—	"
4	—	—	"
5	—	—	" 2mal
6	0,0004	0,0002	" 2 "
7	0,0004	0,0002	" 2 "
8	0,013	0,001	"
9	0,005	0,001	"

Aus den Protokollen ist zu ersehen, daß bei allen Versuchstieren, gleichgültig, ob es junge Hunde (Nr. 4, 5, 7, 8, 9) oder erwachsene Hunde (Nr. 1, 2, 3, 6) waren, ein anaphylaktischer Schock eingetreten ist, wenn sie mit Hammelerythrozyten sensibilisiert worden waren. Hieraus können wir mit vollem Rechte den Schluß ziehen, daß bei Hunden eine zelluläre Anaphylaxie gegen Erythrozyten erzeugt werden kann.

In den meisten Fällen (Nr. 2, 3, 4, 5, 6, 7) war bei den Hunden eine Hypersensibilität gegen Erythrozyten schon nach der ersten Sensibilisierung zu beobachten; nur bei drei Hunden trat der Zustand der Anaphylaxie erst nach zweimaliger Sensibilisierung ein.

Obgleich der Frage über die Antianaphylaxie bei Hunden eine spezielle Untersuchung gewidmet werden wird, muß hier jedoch erwähnt werden, daß in drei Versuchen die Hunde 2mal einen anaphylaktischen Schock durchgemacht haben, d. h. bei der zweiten und dritten „Probe". Dagegen sind zwei Hunde, die einen Schock überstanden hatten, bei nachfolgender Sensibilisierung gesund geblieben (Hund Nr. 2 1mal, Hund Nr. 1 2mal gesund geblieben).

Die Sera aller Hunde waren, mit Ausnahme des Tieres Nr. 2, sehr reich an Hämolysinen; es besteht somit ein Parallelismus zwischen einem scharf ausgesprochenen Schock und dem hohen Gehalt an Antikörpern.

Obwohl bei allen Hunden der Schock sehr scharf ausgeprägt war und von den meisten Tieren sehr schwer ertragen wurde, war in keinem der Fälle eine hämorrhagische Colitis oder ein Exitus unmittelbar nach dem Schock zu beobachten. Dagegen starben die Hunde Nr. 3, 4, 5 und 9 einige Tage nach dem Schock unter Symptomen einer progressiven Kachexie.

Wenn wir die klinischen Symptome eines anaphylaktischen Schocks bei zellulärer Anaphylaxie mit dem Symptomenkomplex bei der Sensibilisierung und bei der Probe mit amorphem Eiweiß vergleichen, so müssen wir den Schluß ziehen, daß dieselben vollkommen identisch sind.

Richet[1]) beschreibt einen anaphylaktischen Schock des Hundes bei Serumanaphylaxie folgendermaßen:

„Die erste Wirkung — handelt es sich um eine schwere Anaphylaxie — ist ein Erbrechen, ein so rapid eintretendes und vorherrschendes Symptom, daß es in vielen Fällen kaum 10 Sek. nach der Injektion selbst einer schwachen Dosis eintritt. Dieses Erbrechen ist so charakteristisch, daß ich es als Kriterium angenommen habe, da es auch leichter als die Blutdrucksenkung wahrzunehmen ist. Man kann sagen, daß es nie fehlt, einige ganz seltene Fälle von außerordentlich intensiver Anaphylaxie ausgenommen. Dann befindet sich das Tier sofort in einem solch geschwächten Zustande, daß es nicht einmal die Kraft zum Erbrechen hat."

„Fast gleich hinterher wird das losgebundene Tier von einem rektalen Tenesmus mit flüssiger, blutiger Diarrhöe ergriffen. Manchmal beinahe rein blutiger Ausfluß durch das Rektum, bei gleichzeitiger heftiger Kolik und Rektaltenesmus. . . . . . Aber die Koliken und die Diarrhöe können nicht eintreten."

„Es gibt sofort eine Ataxie: Das Tier schwankt wie betrunken, bekommt eine Paraplegie . . . . Die Pupille erweitert sich . . . . und nach

1) Richet, Die Anaphylaxie. Leipzig 1920.

einigen kläglichen Schreien fällt das Tier zu Boden .... vollkommen erschöpft, unempfindlich .... in völliger psychischer Abwesenheit. Die Atmung ist beschleunigt, dyspnoisch."

Der Hund bietet uns also ein höchst wertvolles Objekt bei der Untersuchung des zu klärenden Problems.

In der Tat, wenn wir das Verhalten der sensibilisierten Hunde bei einer Probe mit amorphem Eiweiß oder mit Erythrozyten mit dem eines Meerschweinchens oder eines Kaninchens vergleichen, können wir den scharf ausgesprochenen Antagonismus nicht konstatieren, der bei Meerschweinchen und Kaninchen, die auf die Sensibilisierung mit amorphem Eiweiß oder mit Erythrozyten ganz verschieden reagieren, vorhanden ist.

Ein Hund kann stets ebenso leicht mit Zellelementen wie mit Eiweiß sensibilisiert werden und reagiert auf die Probe mit dem einen oder anderen Antigen durch einen anaphylaktischen Schock, welcher in den Hauptzügen ganz gleich verläuft. Das Zustandekommen einer zellulären Anaphylaxie bei dieser Tierart ist ein Grundargument gegen die Ansichten jener Autoren, welche das ungleiche Verhalten der Meerschweinchen gegenüber der Sensibilisierung mit unorganisiertem Eiweiß oder mit Zellelementen benutzen wollten, um die Existenz der zellulären Anaphylaxie zu bestreiten. Die Tatsache, daß es immer leicht gelingt, einen Hund mit nativen Hammelerythrozyten zu sensibilisieren, stürzt die Hypothese von Doerr um, welcher die Unmöglichkeit, ein Meerschweinchen aktiv oder passiv mit Hammelerythrozyten oder mit einem Antihammelerythrozytenserum zu sensibilisieren, durch die Anwesenheit eines heterogenetischen, dem Hammelantigen identischen Antigens in den Organen der Meerschweinchen erklären wollte; ein gleiches Antigen ist aber auch in den Organen eines Hundes vorhanden.

Wenn man Doerrs unbegründete Voraussetzung, nach der die Zellen keine Anaphylaktogene darstellen können, verwirft und nur reale Fakten berücksichtigt, gibt unsere Arbeit, glauben wir, einen unwiderleglichen Beweis der Existenz einer zellulären Anaphylaxie.

Schlußfolgerung.

1) Die zelluläre Anaphylaxie gegen Erythrozyten kann bei Hunden erzeugt werden. Bei allen Hunden, die wir für unsere Versuche gebraucht haben, ist ein anaphylaktischer Schock eingetreten. — 2) In den meisten Fällen waren die Tiere schon nach der ersten Sensibilisierung mit Erythrozyten überempfindlich gegen dieselben; nur drei Hunde mußten 2mal sensibilisiert werden. — 3) Bei manchen Individuen tritt ein anaphylaktischer Schock nur 1mal ein; andere Tiere reagieren auf jede „Probe" mit einem Schock. — 4) Je stärker der Schock sich äußert, desto mehr Antikörper (Hämolysine) sind im Serum des Versuchstieres vorhanden. — 5) Der klinische Symptomenkomplex des Schocks bei zellulärer Anaphylaxie ist in seinen Hauptzügen mit dem Schock bei Serumanaphylaxie identisch.

Nachdruck verboten.

Ueber die Existenz der zellulären Anaphylaxie. II. Passive zelluläre Anaphylaxie bei Hunden.

[Aus dem Mikrobiologischen Institut an der Moskauer Medizinischen Hochschule (2. Staats-Universität), und aus dem Laboratorium des Reichs-Anilintrustes (Direktor Prof. I. L. Kritschewsky).]

Von Prof. Dr. **I. L. Kritschewsky** und Dr. **O. Dukelsky.**

Die strittige Frage über die Existenz der zellulären Anaphylaxie ist von Kritschewsky und Friede, die Untersuchungen über aktive zelluläre Anaphylaxie an Hunden[1]) ausgeführt haben, in positivem Sinne beantwortet worden. Die Autoren haben in ihrer Arbeit den Hund als ein höchst wertvolles Objekt bei der Untersuchung des zu klärenden Problems bezeichnet.

Wenn wir das Verhalten sensibilisierter Hunde bei einer Probe mit amorphem Eiweiß oder mit Erythrozyten mit dem Verhalten von Meerschweinchen oder Kaninchen vergleichen, können wir allerdings den scharf ausgesprochenen Antagonismus nicht konstatieren, der zwischen Meerschweinchen und Kaninchen, die auf die Sensibilisierung mit amorphem Eiweiß oder mit Erythrozyten ganz verschieden reagieren, besteht. Ein Hund kann ebenso leicht mit Zellelementen wie mit Eiweiß sensibilisiert werden und reagiert auf die Probe mit dem einen oder anderen Antigen durch einen anaphylaktischen Shock, der in den Hauptzügen ganz gleich verläuft. Das Zustandekommen einer zellulären Anaphylaxie bei dieser Tierart ist ein Grundargument gegen die Ansichten jener Autoren, die das ungleiche Verhalten der Meerschweinchen gegenüber der Sensibilisierung mit unorganisiertem Eiweiß oder mit Zellelementen benutzen wollten, um die Existenz der zellluären Anaphylaxie zu bestreiten.

Auf Grund dieser Tatsachen haben wir, um die Existenz der zellulären Anaphylaxie zu beweisen, den Hund als Versuchsobjekt gewählt. Wir werden hier keine weiteren Argumente für diese Wahl anführen, sie sind aus der eingangs genannten Arbeit von Kritschewsky u. Friede[2]) zu ersehen.

Da eine deutlich ausgesprochene aktive zelluläre Anaphylaxie jedesmal eintritt, wenn die dazu nötigen Bedingungen im Hundeorganismus erfüllt sind, so lag die Annahme nahe, daß der Hund auch ein passendes Objekt sein werde, um bei ihm eine passive zelluläre Anaphylaxie unter denselben Bedingungen zu erzeugen, bei welchen das Entstehen der passiven Serumanaphylaxie bei anderen Tierarten außer Zweifel steht.

Sollte die Vermutung bestätigt werden, dann würde das Phänomen der zellulären Anaphylaxie eine neue Bestätigung erhalten.

Die Möglichkeit, eine aktive zelluläre Anaphylaxie zu erzeugen, wird noch bis jetzt als zweifelhaft betrachtet; die unten gegebene Uebersicht der hierüber entstandenen Literatur zeigt, daß auch die

1) Kritschewsky u. Friede, Ztschr. für Mikrobiologie, Pathologie und Infektionskrankheiten. 1925. (Russisch).

2) In dieser Arbeit ist die gesamte einschlägige Literatur angegeben und kritisch analysiert worden.

Existenz der passiven zellulären Anaphylaxie nicht minder bestritten wird.

Friedemann[1]), welcher zuerst eine zelluläre Anaphylaxie bei Kaninchen erzeugt hatte, hat gezeigt, daß für das Entstehen einer passiven zellulären Anaphylaxie bei dieser Tierart ganz andere Bedingungen erforderlich sind, als für das Entstehen einer passiven Serumanaphylaxie bei Meerschweinchen. Bei Kaninchen entsteht ein anaphylaktischer Shock, entweder wenn Erythrozyten und ein homologes Immunserum gemischt, intravenös injiziert werden, oder wenn Antigen und Antikörper gleichzeitig oder nach einem kurzen Zeitraum in verschiedene Venen injiziert werden. Wird das Immunserum einige Stunden oder am anderen Tage nach der Antigeneinführung inijziert, dann treten beim Kaninchen nur unbestimmte Symptome ein, oder es sind gar keine Symptome vorhanden.

Doerr u. Moldovan[2]) haben bei Meerschweinchen eine passive zelluläre Anaphylaxie mit letalem Exitus erzeugt, indem sie die Tiere mit 1,5 ccm eines hämolytischen Kaninchenserums (gegen Hammelerythrozyten — 1000 I.E.) intraperitoneal sensibilisiert und nach 24 Std. abnehmende Dosen Erythrozyten (Probe von 1 ccm bis 0,02 ccm 5proz. Erythrozytenaufschwemmung) in die Jugularvene injiziert haben. Bei gleichzeitiger Injektion von Erythrozyten in die eine V. jugularis und von Immunserum in die andere und bei der Injektion einer Mischung derselben entstand bei Meerschweinchen kein anaphylaktischer Shock.

Doerr u. Pick[3]) berichten, ohne indes ihre Protokolle anzuführen, daß es ihnen später nicht gelungen ist, Meerschweinchen passiv gegen Hammelerythrozyten zu sensibilisieren, obwohl die Tiere große Mengen eines höchst aktiven Immunserums intraperitoneal und bedeutende Dosen Antigen intravenös erhielten. Die Tatsache, daß diese Versuche mit den zuvor erwähnten nicht übereinstimmen, wird von den Autoren damit erklärt, daß die Fähigkeit der Meerschweinchenorgane, Antikörper gegen Hammelerythrozyten zu binden, sich in manchen Versuchen stark, in anderen Versuchen nur sehr schwach äußert. Wir verstehen die Aeußerung der Verfasser in dem Sinne, daß das Vorhandensein einer engen Verbindung der Organe mit den eingeführten Antikörpern (die Anwesenheit solcher Verbindung kann durch das Fehlen von Hämolysinen in Bauchhöhle und Blutkreis konstatiert werden) eine passive Sensibilisierung der Tiere unmöglich macht.

Im Gegensatz zu Doerr u. Moldovan haben Schiff u. Moore[4]) nicht vermocht, Meerschweinchen passiv gegen Hammelerythrozyten zu sensibilisieren, obwohl das Immunserum teils sehr hochwertig war und bei der Probe 0,5 und 1,0 ccm sedimentierter Erythrozyten injiziert wurden.

Thiele u. Embleton[5]) haben Meerschweinchen mit hämolytischem Kaninchen- oder Meerschweinchenserum (gegen Hammelerythrozyten) sensibilisiert und nach 48 Std. eine intravenöse Probe mit 0,6 ccm 10proz. Hammelerythrozytenaufschwemmung angestellt. Jedesmal, wenn die Zahl der eingeführten I.E. genügend war, haben die Verfasser einen Shock (22 Fälle) und zumeist auch den Tod der Versuchstiere (15 Fälle) konstatieren können. Die Verfasser haben dabei gezeigt, daß bei Meerschweinchen eine passive zelluläre Anaphylaxie auch ohne Inkubationsperiode erzeugt werden kann, wenn der Zeitraum zwischen Sensibilisierung und Probe 10 Min. nicht übersteigt (intravenöse Sensibilisierung mit 2500 bis 3000 I.E. enthaltendem hämolytischen Serum und intravenöse Probe mit 0,6 ccm 10proz. Erythrozytenaufschwemmung).

Wir betrachten als genügend beweisend die Versuche Friedemanns, der dargetan hat, daß eine passive zelluläre Anaphylaxie bei Kaninchen sich erzeugen läßt. Man darf aber selbstverständlich nicht erwarten, daß bei Kaninchen der anaphylaktische Shock bei passiver zellulärer Anaphylaxie unter denselben Bedingungen eintritt wie bei Meerschweinchen.

Thomsen[6]) und Doerr[7]) wollen indes den bei Kaninchen entstehenden Symptomenkomplex keineswegs als einen anaphylaktischen Shock anerkennen.

Die Untersuchungen von Doerr u. Pick und von Thiele u. Embleton haben gezeigt, daß die passive zelluläre Anaphylaxie bei Meerschweinchen unter den gleichen Bedingungen eintritt wie die passive Serumanaphylaxie; nur

1) Friedemann, Ztschr. f. Immunitätsforsch. Bd. 2.
2) Doerr u. Moldovan, Ztschr. f. Immunitätsforsch. Bd. 5.
3) Doerr u. Pick, Biochem. Ztschr. Bd. 50.
4) Schiff u. Moore, Ztschr. f. Immunitätsforsch. Bd. 22.
5) Thiele u. Embleton, Ztschr. f. Immunitätsforsch. Bd. 20.
6) Thomsen, Ztschr. f. Immunitätsforsch. Bd. 3.
7) Doerr, Weichardts Ergebnisse. Bd. 1.

Tabelle I.
Passive zelluläre Anaphylaxie.
Intravenöse „Probe", 24 Std. nach intraperitonealer Injektion eines homologen Immunserums.

Nr. der Tiere	Gewicht in g	Menge des Immunserums in ccm	Hämolytischer Serumtiter	Dosis der 50proz. Erythrozytenaufschwemmung	Resultat
12	4300	7	1000 IE.	4,5 ccm Ziegenerythrozyten	Leichte Unruhe; Dyspnoe; Abgang von Urin; Durchfall.
150	1650	4	dgl.	2,0 ccm Ziegenerythrozyten	Nach 3 Min. Abgang von halbflüssigem Stuhl und Urin.
148	1420	3	„	3,0 ccm Ziegenerythrozyten	Anfälle von tonischen und klonischen Krämpfen während 2 Min., alsdann Paralyse der Extremitäten. Nach 30 Min. hat sich das Tier allmählich erholt.
128	5650	7	800 IE.	6,0 ccm Ziegenerythrozyten	Nach 1 Min. Durchfall.
147	5500	7	1000 IE.	6,0 ccm Ziegenerythrozyten	Während einiger Minuten wackelnder Gang, wie betrunken (Ataxie).
20	5500	8	800 IE.	5,5 ccm Ziegenerythrozyten	Manegebewegungen (läuft); gellender lauter Schrei. Nach 1 Min. ist das Tier gesund.
174	7500	9	dgl.	7,5 ccm Ziegenerythrozyten	Nach 50 Sek. Erbrechen. Abgang von Urin; Parese der Extremitäten. Nach $1^1/_2$ Min. gesund.
126 x	3500	6	600 IE.	4,0 ccm Hammelerythrozyten	Manegebewegungen; lauter Schrei; Jucken der Schnauze; Parese der Extremitäten. Nach 5 Min. gesund.
133 x	2900	3	dgl.	3,0 ccm Hammelerythrozyten	Manegebewegungen; lauter Schrei. Nach 1 Min. gesund.
132 x	2900	4	„	3,0 ccm Hammelerythrozyten	Starke Unruhe; lauter Schrei und Manegebewegungen während 1 Min.
134 x	6500	8	„	6,5 ccm Hammelerythrozyten	Keine Erscheinungen.
135 x	3200	6	„	4,0 ccm Hammelerythrozyten	Wackelnder Gang, wie betrunken (Ataxie), alsdann Parese der Extremitäten (Brechbewegungen und Erbrechen 4mal). Nach 5 Min. hat sich das Tier erhoben und allmählich erholt.
137 x	5000	10	„	5,0 ccm Hammelerythrozyten	Dyspnoë.
194	5000	7	200 IE.	5,0 ccm Hammelerythrozyten	Keine Erscheinungen.
195	3000	5	dgl.	2,0 ccm Hammelerythrozyten	Unruhiger Zustand; wackelnder Gang, wie betrunken (Ataxie); das Tier fällt alsdann auf die Seite und liegt während 30 Min. bewegungslos, wonach es sich allmählich erholt.
399	4300	4	800 IE.	4,0 ccm Ziegenerythrozyten	Nach 1 Min. wird das Tier unruhig, läuft im Zimmer umher, ohne etwas von sich zu sehen, stößt auf Gegenstände, springt und fällt hin; lauter Schrei. Nach 1 Min. gesund.
170	4400	7	dgl.	5,0 ccm Ziegenerythrozyten	Dieselben Erscheinungen wie bei Nr. 399.

Mit x sind die Tiere bezeichnet worden, welche unmittelbar vor dem Versuch gefüttert worden sind.

die Grunddifferenz, die zwischen den Ansichten von Doerr u. Pick und Thiele u. Embleton einerseits und von Doerr u. Moldovan und Schiff u. Moore andererseits besteht, erlaubt es nicht, die passive zelluläre Anaphylaxie als ein unbestreitbares Phänomen anzusehen.

Tabelle II.
Passive zelluläre Anaphylaxie.
Gleichzeitige intravenöse Injektion einer Mischung von Immunserum + homologe Erythrozyten.

Nr. der Tiere	Gewicht in g	Menge des Immunserums in ccm	Hämolytischer Serumtiter	Dosis der 50proz. Erythrozytenaufschwemmung	Resultat
263	2200	3	800 IE.	6,0 ccm Ziegenerythrozyten	Tonische und klonische Krämpfe; Erbrechen, Durchfall. Nach 3 Min. gesund.
270	1950	2	dgl.	2,0 ccm Ziegenerythrozyten	Starkes Zittern und Winseln. Sonst keine Erscheinungen.
160	1820	2,25	1000 IE.	4,5 ccm Ziegenerythrozyten	Parese der Extremitäten. Durchfall. Nach 8 Min. gesund.
146	6000	7,5	dgl.	4,0 ccm Ziegenerythrozyten	Manegebewegungen; lauter gellender Schrei. Nach 2 Min. ist das Tier gesund.
149	3320	3,25	"	6,5 ccm Ziegenerythrozyten	Manegebewegungen, Durchfall; Jucken der Schnauze während 15 Min.
195	2000	2,5	600 IE.	5,0 ccm Hammelerythrozyten	Zuerst Durchfall und Parese der Extremitäten; nach 2 Min. ist das Tier auf die Seite gefallen und lag bewegungslos, wie tot. Erst nach 20 Min. hat sich das Tier erholt.
136	2200	2,75	"	5,5 ccm Hammelerythrozyten	Sofort Erbrechen, das Tier fällt auf die Seite mit tonischen und klonischen Krämpfen. Gesund nach 8 Min.
139	2300	3	"	6,0 ccm Hammelerythrozyten	Sofort ist ein komatöser Zustand und Parese aller Sphinkter eingetreten. Während 16 Min. befindet sich der Hund in einem Zustande, welcher der Katatonie gleicht: wenn es in irgendeine Lage gelegt wird, verharrt es in derselben, die Extremitäten behalten ebenfalls die Lage, welche ihnen gegeben wird. Nach 6 Min. befindet sich das Tier in einem Paresezustande, wonach es sich erhebt, aber beim Gehen wackelt, wie betrunken (Ataxie). Erst 45 Min. nach dem Beginn des Versuches hat sich das Tier gänzlich erholt.
166	3000	3,25	"	6,5 ccm Ziegenerythrozyten	Nach 2 Min. Erbrechen, welches sich 6mal wiederholte; in den Intervallen Brechbewegungen und Tenesmen; nach 1 Min. Durchfall; wackelnder Gang wie betrunken (Ataxie). Nach 10 Min. gesund.
138	2500	3,25	800 IE.	6,5 ccm Hammelerythrozyten	Sofort Erbrechen und Krämpfe. Das Tier hat sich bald erholt.

Wenn also das Phänomen der zellulären Anaphylaxie bei Kaninchen wie bei Meerschweinchen bestritten wird, so ist es notwendig, die Untersuchung dieser Frage an einer anderen Tierart, nämlich an Hunden, anzustellen.

Wir haben die Untersuchung der passiven zellulären Anaphylaxie bei Hunden in zwei Modifikationen angestellt. 17 Hunde wurden 24 Std. vor einer intravenösen „Probe“ (mit Hammel- oder Ziegenerythrozyten) mit einem homologen Immunserum i.p. sensibilisiert (Tab. I, S. 70). 10 Hunde erhielten i.v. eine Mischung von Immunserum und entsprechenden Erythrozyten (Tab. II, S. 71).

Die erste Modifikation glich somit jener einzigen Versuchsanstellung, welche es erlaubt, eine passive Serumanaphylaxie bei Meerschweinchen zu erzeugen; die zweite Modifikation war der Versuchsanordnung gleich, durch welche die vielfach bestrittene passive zelluläre Anaphylaxie bei Kaninchen erzeugt werden kann [1]).

Die Auszüge aus unseren Protokollen (Tab. I u. II) zeigen, daß bei Hunden eine passive zelluläre Anaphylaxie eintritt, unabhängig davon, ob die „Probe“ 24 Std. nach der passiven Sensibilisierung oder gleichzeitig mit derselben stattfindet, und daß auch dabei der anaphylaktische Shock sehr scharf oder zum mindesten ganz deutlich ausgeprägt ist.

So haben wir gezeigt, daß bei Hunden eine passive zelluläre Anaphylaxie unter denselben Bedingungen wie bei Meerschweinchen erzeugt werden kann (Tab. I). Damit müssen alle Autoren befriedigt sein, die, wie Schiff u. Moore [2]), nur in dem Falle eine zelluläre Anaphylaxie bei Kaninchen anerkennen wollen, wenn dieselbe unter den gleichen Bedingungen eintreten und in der gleichen Weise verlaufen würde wie die Serumanaphylaxie bei Meerschweinchen.

Unsere Versuche haben auch die Ergebnisse von Kritschewsky u. Friede [3]) bestätigt, daß der Hund hinsichtlich der Möglichkeit, Anaphylaxie bei dieser Tierart zu erzeugen, eine Zwischenstellung zwischen Kaninchen und Meerschweinchen einnimmt.

Es kann also beim Hund die passive zelluläre Anaphylaxie unter denselben Bedingungen erzeugt werden, unter denen die Serumanaphylaxie bei Meerschweinchen wie auch die als zweifelhaft betrachtete zelluläre Anaphylaxie bei Kaninchen stattfindet. Diese Tatsache müßte, glauben wir, auch solche Skeptiker wie Thomsen, Doerr, Schiff und Moore vollkommen überzeugen, daß die zelluläre Anaphylaxie eine ebenso reale Tatsache darstellt wie die Serum-

1) Unsere Kenntnisse über die passive Serumanaphylaxie bei Kaninchen widersprechen einander gewissermaßen. Friedemann u. Scott behaupten, daß Kaninchen sofort nach der Injektion eines Immunserums passiv sensibilisiert werden, daß aber nach 24 Std. das Tier auf eine Antigeneinführung nur mit unbestimmten Symptomen reagiert. Es wird also damit eine Analogie mit den Bedingungen festgestellt, nach denen eine passive zelluläre Anaphylaxie bei derselben Tierart erzeugt werden kann.

Friedberger und seine Mitarbeiter sind dagegen der Meinung, daß, sofern es sich um die Möglichkeit handelt, bei Meerschweinchen oder Kaninchen eine passive Anaphylaxie zu erzeugen, es keinen Grundunterschied zwischen den beiden Tierarten gibt.

Arthus behauptet, eine passive Serumanaphylaxie bei Kaninchen sei „assez difficile à manifester de façon indiscutable“.

2) Schiff u. Moore, Ztschr. f. Immunitätsforsch. Bd. 22.

3) Kritschewsky u. Friede, l. c.

anaphylaxie, und daß sie bei Hunden wie auch bei Kaninchen erzeugt werden kann [1]).

Wenn wir die Ergebnisse von Kritschewsky u. Friede und unsere Versuche betrachten, glauben wir annehmen zu dürfen, daß unsere an Hunden ausgeführten Untersuchungen die Existenz einer zellulären Anaphylaxie durchaus bewiesen haben.

Der klinische Symptomenkomplex verläuft bei Hunden bei passiver zellulärer Anaphylaxie in den Hauptzügen ebenso wie bei aktiver zellulärer Anaphylaxie [2]). (Siehe unsere Tabelle.)

Es muß hier vermerkt werden, daß Erbrechen bei passiver Anaphylaxie seltener eintritt als bei aktiver.

Schlußfolgerung.

Bei Hunden kann passive zelluläre Anaphylaxie unter gleichen Bedingungen erzeugt werden, unter denen auch die Serumanaphylaxie bei Meerschweinchen und die bisher als zweifelhaft betrachtete zelluläre Anaphylaxie bei Kaninchen eintreten.

Hieraus dürfen wir schließen, daß die zelluläre Anaphylaxie eine ebenso reale Tatsache ist wie die Serumanaphylaxie.

Ueber Ersatzmittel des Fleischwassers und des Peptons für Bakteriennährböden.

[Aus dem Tierhygienischen Institut der Universität München. (Vorstand: Prof. Dr. Karl Süpfle)].

Von Dr. med. vet. **Martin Hoerning**, Stabsveterinär a. D.

War in der Vorkriegszeit für die Herstellung von Bakteriennährböden ausschließlich die Zweckmäßigkeit maßgebend, so muß heute auch die Beschaffungsmöglichkeit und der Kostenpunkt berücksichtigt werden. Denn einerseits verbieten die verschiedensten Erwägungen die uneingeschränkte Benutzung von Stoffen, die der menschlichen Ernährung dienen, andererseits sind die Hauptverbraucher der Bakteriennährböden, die wissenschaftlichen Institute, heute vollständig verarmt und zur größten Einschränkung gezwungen.

Insbesondere mußte man bemüht sein, einen Ersatz für Fleisch zu finden. Man hat daher als Nährbodengrundstoff Auszüge aus pflanzlichen Materialien versucht, aus Reis, Gerste, Weizen, Haferflocken, Kartoffeln, Bohnen, Pilzen u. a. Am aussichtsreichsten erschienen die Bemühungen, Hefe zur Nährbodenherstellung zu verwenden. Zwar wurden schon früher vereinzelt Hefenährböden benutzt, so von Beijerinck, Schoenfeld, Will u. a. Allgemeineres Interesse fanden aber erst die Studien von

1) Eine passive zelluläre Anaphylaxie kann bei Hunden, scheinbar, wie unmittelbar nach der Einführung eines Immunserums (Manwaring — nach 5 Min.), so auch einige Stunden (Richet — nach 1—2 Std.), oder auch einige Tage (Richet — nach 19 Tagen) nach derselben erzeugt werden.

2) Kritschewsky u. Friede, l. c.

Fischer, Bitter u. Wagner[1]), ferner die Veröffentlichungen von Guggenheimer[2]), von Gassner[3]) und Reiter[4]). Die nach dem Kammannschen Verfahren hergestellten Hefepräparate erwiesen sich in den ausgedehnten Versuchen von Jötten[5]) sowie von Kister[6]) für verschiedene Verwendungszwecke als gut geeignet. Ebenso fand Max Brandl[7]) in dem von den Münchener Cenovis-Nährmittelwerken nach den Angaben von Dr. Mandelbaum verfertigten Nährbodenpulver, das Hefeextrakt enthielt, einen im großen und ganzen recht brauchbaren Ersatz der Fleischwassernährböden. Das „Cenovis-Nährbodenpulver" wird jedoch seit einiger Zeit nicht mehr vertrieben.

Es erschien daher angebracht, festzustellen, inwieweit das Hefeextrakt, das die Cenovis-Werke für Küchenzwecke vertreiben, als Grundstoff für Bakteriennährböden an Stelle von Fleischwasser benutzt werden kann. Gleichzeitig bot es Interesse, zu prüfen, ob das Pepton bei der Nährbodenherstellung durch andere, womöglich billigere Präparate ersetzt werden könne. Auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Karl Süpfle, dem ich für seine liebenswürdige Unterstützung ergebenst danke, übernahm ich diese Aufgabe und unterzog auch das von E. Merck auf Veranlassung und nach Angabe von H. Kuczynski und Ferner[8]) in den Handel gebrachte Nährbodenpräparat „Standard I" einer vergleichenden Prüfung.

Eigene Versuche.

Ich untersuchte zunächst, wie sich als Bakteriennährstoffe verschiedene Eiweißpräparate eignen, die bisher noch nicht in dieser Richtung geprüft worden sind. Es waren uns von der Chemischen Fabrik von Heyden, Radebeul-Dresden zur Verfügung gestellt worden unter anderem: 1) Präparat Heyden Nr. 533, alkalisches Spaltungsprodukt aus Albumin in Form des Natriumsalzes; 2) Präparat Heyden Nr. 534, alkalisches Spaltungsprodukt aus Kasein, ebenfalls in Form des Natriumsalzes; 3) Präparat Kalodal (Eiweißabbauprodukt); 4) Präparat Heyden Nr. 536, Albumose aus der Kalodalmutterlauge, eine Oxydationsalbumose von schwach saurer Reaktion.

In zeitraubenden Versuchen, deren Ergebnisse nur summarisch mitgeteilt werden sollen, wurde festgestellt, welche Konzentration dieser Präparate die Bakterienvermehrung am meisten begünstigen; als Testobjekte dienten einerseits anspruchslose Bakterienarten (Bact. prodigiosum, Bact. proteus, Bac. subtilis), andererseits anspruchsvollere Arten (Bact. septic. haemorrhagicae, Bakterien der Typhus- und Paratyphus-Gruppe, Bact. dysenteriae Kruse-Shiga, Vibrio Metschnikovii). Es wurde sowohl geprüft, was die Präparate leisten, wenn sie in Fleischwassernährböden an Stelle des Peptons verwandt würden, als auch in Nährböden ohne Fleischwasserzusatz. Zum Vergleich wurden dieselben Bakterienarten jeweils auf die üblichen Fleischwassernährböden mit und ohne Peptonzusatz überimpft.

Die nach den verschiedensten Richtungen hin variierten Versuche mit derart bereiteten Nährlösungen in flüssiger Form, ferner mit Zusatz von Gelatine bzw. Agar ergaben, daß die genannten Präparate zwar in gewissen Zubereitungsweisen eine beachtenswerte, gelegentlich auch gute Bakterienvermehrung ermöglichen, aber für die praktischen Zwecke der Nährbodenherstellung keinen Fortschritt bedeuten. Nur das Präparat Kalodal zeichnete sich durch auffällige Wachstumsförderung aus:

---

1) Fischer, Bitter u. Wagner, Münch. med. Woch. 1915. S. 770.
2) Guggenheimer, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 77. S. 363.
3) Gassner, ebendas. Bd. 79.
4) Reiter, Dtsch. med. Woch. 1917.
5) Jötten, Arb. a. d. Reichsgesundheitsamt. Bd. 25. H. 2.
6) Kister, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 87. S. 477.
7) Brandl, Münch. med. Woch. 1921.
8) Kuczynski u. Ferner, Klin. Woch. 1923. S. 826.

auf flüssigen und festen Fleischwassernährböden mit 3 Proz. Kalodal (an Stelle von 1 Proz. Pepton) wuchsen alle geprüften Bakterienarten durchweg ebenso üppig und charakteristisch, wie auf gewöhnlichen Fleischwassernährböden mit 1 Proz. Pepton (Witte).

Hatte ich in dem Kalodal ein Ersatzpräparat des Peptons gefunden, so konnte ich mich nunmehr der Frage zuwenden, inwieweit das Hefepräparat „Cenovisextrakt" an die Stelle von Fleischwasser treten kann. Um die Leistungsfähigkeit dieses Hefeextraktes richtig beurteilen zu können, verglich ich Nährböden aus Cenovis einerseits mit gewöhnlichen Fleischwasserpeptonnährböden, andererseits mit dem neuen Merckschen Nährbodenpulver „Standard I"; die hieraus hergestellten Nährböden eignen sich nach Kuczynski und Ferner zur Kultivierung auch anspruchsvoller Bakterienarten; das Präparat „Standard II", das von den Verff. zur Züchtung weniger anspruchsvoller Bakterien empfohlen wird, habe ich nicht geprüft.

Nachdem mit Unterstützung des Assistenten am Institut, Herrn Dr. Paul Hofmann, analysiert worden war, daß das Cenovisextrakt 4,7 Proz. Gesamtstickstoff und 44,5 Proz. Kochsalz enthält, bereiteten wir die Cenovisnährböden so, daß 4 g Cenovis mit 3,2 g Kochsalz zu einem Liter Nährflüssigkeit verarbeitet wurden, der gegebenen Falles 1,8 Proz. Agar bzw. 10 Proz. Gelatine zugesetzt wurde; zur Alkalisierung wurde so viel Kalilauge zugefügt, daß eine Probe des Nährbodens mit Phenolphthalein schwache, aber deutliche Rosafärbung gab. Pepton wurde den Cenovisnährböden in dieser Versuchsreihe nicht beigemischt.

Die Merck-Nährböden wurden aus „Standard I", der von der Firma E. Merck in entgegenkommender Weise dem Institut zur Verfügung gestellt worden war, so hergestellt, daß 25 g des Pulvers in 1 l Wasser gelöst wurden, gegebenen Falles wieder unter Zusatz von 1,8 Proz. Agar bzw. 10 Proz. Gelatine; die Alkalisierung erfolgte in der gleichen Weise wie bei den Cenovisnährböden und den Fleischwasserpeptonnährböden, die im übrigen nach dem üblichen Rezept dargestellt wurden.

Es konnten also nebeneinander verglichen werden: 1) Fleischwasserpeptonagar, Cenovisagar, Merck-Agar; 2) Fleischwasserpeptonbouillon, Cenovisbouillon, Merck-Bouillon; 3) Fleischwasserpeptongelatine, Cenovisgelatine, Merck-Gelatine. Alle diese Nährböden wurden mit 45 verschiedenen hygienisch wichtigen Bakterienarten beimpft; nach Bebrütung bei 37° bzw. 22° wurde die Farbe und Ueppigkeit des Kulturbelages der Schrägagarröhrchen, Art und Grad der Trübung der Bouillonröhrchen, Form des beimpften Stichkanals und Intensität der Verflüssigung in den Gelatineröhrchen geprüft und verglichen. Ebenso wurde das mikroskopische Verhalten in den verschiedenen Nährböden geprüft, die Beweglichkeit in Bouillon, die Form und Färbbarkeit der einzelnen Arten in den auf Agar entstandenen Kulturbelägen.

Bei diesen Vergleichsprüfungen zeigte sich im großen und ganzen, daß die Cenovisnährböden den meisten Bakterienarten etwa ebenso gute Ernährungsbedingungen zu gewähren scheinen, wie die analogen Fleischwasserpeptonnährböden; einige Arten gedeihen auf Fleischwasserpeptonnährböden etwas besser, andere Arten umgekehrt auf Cenovisnährböden. So wachsen üppiger auf Cenovis: Streptococcus pyogenes, Streptococcus acidi lactici, Bact. pneumoniae Friedländer, Bact. ozaenae, Bact. viscos. equi, Mycobact. tuberculosis var. poikilotherm., Mycobact. lacti-

cola, Actinomyces bovis, A. pluricolor, A. carneus. Spärlicher als auf Fleischwasserpeptonnährböden war auf Cenovisnährböden das Wachstum von: Bact. septic. haemorrhag., Bact. fluorescens, Bact. putidum, Bact. syncyaneum, Bact. proteus, Bact. erysipelatis suum, Vibrio Metschnikovii, Spirillum volutans, Corynebact. abort. endem. (Bang). Namentlich die Farbstoffbildung war bei Bact. syncyaneum, Bact. violaceum und der Fluorescensgruppe auf Cenovisnährböden erheblich vermindert. Im mikroskopischen Bild wichen die auf Cenovis gewachsenen Kulturen in nichts von dem Aussehen der Fleischwasserpeptonkulturen ab; die Sporenbildner kamen ausnahmslos zu reichlicher Versporung.

Im Vergleich zu Cenovis schienen die Merck-Nährböden den geprüften Bakterienarten nicht ganz so gute Lebensbedingungen zu bieten. Besser als auf Fleischwasserpepton und auf Cenovisnährböden gedeihen lediglich Sarcina rosea und Actinomyces bovis auf Merck-Agar; dagegen blieb auf Merck-Nährböden deutlich geringer das Wachstum von Sarcina lutea, Bact. fluorescens, Bact. putidum, Bact. violaceum, Bact. lactis saponacei, Vibrio Metschnikovii, Spirillum volutans, Mycobact. tuberculosis var. poikolotherm. Auch muß hervorgehoben werden, daß das mikroskopische Aussehen einiger Bakterienarten, die auf Merck-Agar gewachsen waren, ungewohnte Bilder gibt und abweicht von den Formen, die die gleiche Art nach Kultur auf Cenovis- und Fleischwasserpeptonagar zeigt: die Bakterien sehen vielfach insgesamt deutlich größer aus, oder es ist ein Teil der Exemplare größer, so daß gelegentlich eine überraschende Unregelmäßigkeit der Form resultiert. Auch waren die in Merck-Bouillon gewachsenen eigenbeweglichen Bakterienarten teilweise weniger gut beweglich als die in Cenovis bzw. Fleischwasserpeptonbouillon gezüchteten. Jedenfalls kamen alle Bakterienarten auf allen Nährböden zur Vermehrung, das Aussehen der Bouillonkulturen, die Verflüssigung der Gelatine entsprachen dem Typus der Kulturen in Fleischwasserpeptonnährböden.

Auch in der Lebensdauer der Kulturen traten keine bemerkenswerte Unterschiede zutage. Die Schrägagarkulturen der 45 verschiedenen Bakterienarten blieben, nachdem sie bei der jeweiligen optimalen Temperatur ihr Wachstumsmaximum erreicht hatten, bei $+ 15^0$ im Dunkeln 3 Monate aufbewahrt. Als danach die Kulturen auf neue Nährböden abgeimpft wurden, kamen alle auf den verschiedenen Nährböden kultivierten Bakterienarten zur Vermehrung; nur die auf Cenovisagar gezüchtete Schweinerotlaufkultur und die auf Merck-Agar gezüchtete Kultur von Vibrio Metschnikovii waren nicht mehr lebensfähig.

Trotz der sorgfältigen Berücksichtigung aller wahrnehmbaren makroskopischen und mikroskopischen Merkmale der Bakterienkulturen durfte ich aus der bisherigen Prüfung nur qualitative Schlüsse ziehen. Wollte ich den quantitativen Nachweis führen, um wieviel mehr oder wieviel weniger zahlenmäßig der eine Nährboden leistet als der andere, so mußte ich eine andere Versuchsanordnung treffen. Am geeignetsten erwies es sich, auf die Oberfläche frisch gegossener, passend vorgetrockneter Agarplatten eine so verdünnte Bakterienaufschwemmung auszustreichen, daß kein konfluierender Belag entstand, sondern isolierte zählbare Kolonien aufgehen mußten. Bringt man bei derartigem Vorgehen auf Agar der gleichen Herstellung in mehreren Parallelver-

suchen mit einer Oese bekannten Inhaltes die gleiche Bakterienmenge zur Verteilung, so sieht man auf sämtlichen Platten nach Bebrütung bei passender Temperatur die gleiche Anzahl Kolonien aufgehen; die Schwankungen in der Koloniezahl einer Serie erreichen — bei Beherrschung der Technik — höchstens 15 Proz. Da im allgemeinen durchaus nicht alle lebensfähigen Keime, die wir auf einen Nährboden aussäen, als Kolonien aufgehen, sondern nur ein gewisser, von dem Nährstoffgehalt abhängiger Teil, so ist zu erwarten, daß wir ganz verschiedene Koloniezahlen erhalten, wenn wir die gleiche Bakterienmenge auf Agarplatten verschiedenartigen Nährstoffgehaltes bringen: je besser der Nährboden, desto größer muß der Prozentsatz der ausgesäten Keime werden, die befähigt werden, Kolonien zu bilden. Entsprechend muß sich die Größe der entstandenen Kolonien verhalten. Auf diesen Erwägungen war meine Versuchsanordnung aufgebaut.

Je eine Serie verschiedenartiger Agarnährböden wurde mit der gleichen Keimmenge einer bestimmten Bakterienart in der beschriebenen Weise beimpft, und zwar wurden von jeder Nährbodensorte gleichzeitig mindestens 4 Platten angelegt. Alle Prüfungen wurden mehrere Male wiederholt; die Ergebnisse fielen stets gleichsinnig aus. Die entstandenen Kolonien wurden einerseits gezählt und aus den Zahlen der zusammengehörigen Parallelversuche das arithmetische Mittel berechnet. Andererseits wurden die Kolonien bezüglich ihres Durchmessers gemessen; es geschah dies bei schwacher Vergrößerung mittels eines Okularmikrometers; die erhaltenen Werte wurden in Millimeter umgerechnet; 1 Okularmikrometerteilstrich hatte bei dem von mir benützten optischen System und bei einer Tubuslänge von 160 mm, wie mit Hilfe eines Objektmikrometers festgestellt wurde, einen Wert von 333,33 μ.

Um verlässige Durchschnittswerte zu erhalten, maß ich jeweils wahllos 10 Kolonien einer Platte und zog aus den gewonnenen Zahlen den Mittelwert. Da die Größe einer Kolonie, abgesehen von der Güte des Nährbodens, auch von dem Spielraum abhängt, der den Keimen auf der Platte zur Verfügung steht, mußte darauf geachtet werden, innerhalb einer Versuchsreihe nur solche Kolonien zu messen, die auf Platten mit ungefähr gleicher Kolonienzahl gewachsen waren. Ohne Berücksichtigung dieser Forderung hätte ich nicht unerhebliche Fehler begangen: auf einem schlechten Nährboden kommen von den ausgesäten Keimen zwar nur wenige zur Koloniebildung, und die sich entwickelnden Kolonien haben die Tendenz zu einer geringen Koloniegröße. Trotzdem ist die wirklich erreichte Koloniegröße dieser spärlichen, daher durch einen großen Spielraum begünstigten Kolonien erheblicher, als die Größe von Kolonien, die auf einem gleich schlechten Nährboden nach sehr reichlicher Keimaussaat in vermehrter Zahl zur Entwicklung kommen; die Koloniegröße ist aber auch erheblicher, als die Größe von Kolonien, die nach geringer Keimaussaat auf einem relativ besseren Nährboden aufgehen: denn die Kolonien gehen hier in großer Zahl auf, müssen aber durch einen kleinen Spielraum beengt heranwachsen und bleiben daher — ungeachtet ihrer Tendenz zu einer stattlichen Koloniegröße — relativ klein.

Mittels solcher zählender und messender Untersuchungen prüfte ich vergleichsweise nebeneinander folgende 8 Nährbodensorten:

1) **Fleischwasseragar ohne Pepton**; 2) Fleischwasseragar mit 1 Proz. Pepton; 3) **Fleischwasseragar mit 3 Proz. Calodal**; 4) Cenovis-Agar ohne Pepton (4 g Cenovis, **3,2 g Kochsalz, 18 g Agar, 1 l** Wasser); 5) Cenovis-Agar mit 1 Proz. Pepton; 6) Ce-

novis-Agar mit 3 Proz. Kalodal; 7) Merck-Agar (25 g „Standard I" — Pulver, 10 g Agar, 1 l Wasser); 8) Nährstoff-Heyden-Agar (5 g „Nährstoff Heyden", 5 g Kochsalz, 18 g Agar, 1 l Wasser).

Diese verschiedenen Nährböden wurden gleichzeitig mit derselben, bald größeren, bald kleineren Keimmenge beimpft; als Testobjekte wurden sowohl anspruchsvolle Bakterienarten als auch genügsame Arten gewählt, nämlich: Micrococcus (Staphylococcus) pyogenes, Micr. roseus, Bact. pneumoniae Friedländer, Bact. coli, Bact. prodigiosum, Bac. subtilis, Vibrio Metschnikovii, Corynebact. pseudodiphtheriticum.

Unter den besprochenen Kautelen wurde nach Bebrütung bei passender Temperatur die Zahl und die Größe der aufgegangenen Kolonien bestimmt. Beispiele für die hierbei protokollierten Befunde geben die in Tabelle I und II aufgeführten Versuche. Verfolgt man in den Tabellen die vertikalen Stäbe, so sieht man, wie sich der bessere oder schlechtere Nährwert der einzelnen Nährböden in der Zahl der Kolonien und in der Größe des Koloniendurchmessers ausdrückt. Man erkennt den bedeutenden, vielfach überraschend großen Einfluß des Zusatzes

Tabelle I.
Kolonienzahl auf verschiedenen Nährböden nach gleichartiger Bakterienaussaat.

	Bacterium Pneum. Friedländer	Bacterium coli	Bacterium prodigiosum	Bacillus subtilis	Corynebact. pseudo-diphtheritic.	Micrococc. ros.	Micrococc. pyog.	Vibrio Metschnikov.
Fleischwasseragar ohne Pepton	46	9	68	80	42	.	.	26
Fleischwasseragar mit Pepton	70	13	100	143	63	112	12	140
Fleischwasseragar mit Kalodal	83	14	130	150	42	53	14	135
Cenovisagar ohne Pepton	60	11	125	141	27	65	15	40
Cenovisagar mit Pepton	76	18	140	.	.	78	17	148
Cenovisagar mit Kalodal	57	19	.	.	.	.	12	.
Merck-Agar	88	14	56	126	38	34	10	.
Nährstoff-Heyden-Agar	65	18	76	142	35	85	.	.

Tabelle II.
Koloniengröße (in Millimeter Durchmesser) auf verschiedenen Nährböden.

	Bacterium Pneum. Friedländer	Bacterium coli	Bacterium prodigiosum	Bacillus subtilis	Corynebact. pseudo-diphtheritic.	Micrococcus ros.	Micrococc. pyog.	Vibrio Metschnikov.
Fleischwasseragar ohne Pepton	0,32	0,93	0,50	0,94	0,50	.	.	0,38
Fleischwasseragar mit Pepton	0,51	1,92	0,89	1,97	1,19	0,59	0,83	0,93
Fleischwasseragar mit Kalodal	0,68	2,13	0,77	1,57	1,03	0,44	0,78	0,52
Cenovisagar ohne Pepton	0.97	1,69	0,80	1,18	0,79	0,51	0.67	0,60
Cenovisagar mit Pepton	1,20	2,32	0,90	.	.	0,60	0,96	0,70
Cenovisagar mit Kalodal	1,24	2,25	.	.	.	.	0.83	.
Merck-Agar	0,36	1,31	0,46	1,15	.	0,56	0,85	.
Nährstoff-Heyden-Agar	0,75	1,18	0,41	1,04	0,48	0,27	.	.

von Pepton zum Fleischwasseragar; man überzeugt sich, daß der Fleischwasserpeptonagar, wenn man alle Resultate vergleicht, in seiner Art unübertrefflich ist und allen geprüften Bakterien gute Ernährungsbedingungen verschafft, den meisten Arten sogar die besten Ernährungsbedingungen. Im Vergleich zu dem Fleischwasserpeptonagar leisten alle von mir untersuchten Nährböden weniger insofern, als sie zwar den meisten Bakterienarten ein gutes, vielfach ein ausgezeichnetes Gedeihen ermöglichen, aber einzelne Arten nur zu mittelguter Vermehrung bringen. Gewiß ist dieser Mangel nicht derart, daß er die praktische Verwendbarkeit des einen oder des anderen Ersatznährbodens unter allen Umständen stören müßte; aber es bleibt ein Nachteil, dessen man sich bewußt bleiben muß, wenn man auf Fleischwasserpeptonnährböden verzichtet. Es gibt bakteriologische Aufgaben, für die bis jetzt Fleischwasserpeptonnährböden unentbehrlich sind.

Versuchen wir, die einzelnen Ersatznährböden nach ihrer Güte zu ordnen, so ist das Cenovisextrakt zweifellos ein vielfach brauchbarer Ersatz des Fleischwassers; der aus dem Merckschen „Standard I"-Pulver bereitete Agar bietet im Durchschnitt den Bakterien weniger gute Vermehrungsbedingungen als Cenovisagar; im allgemeinen gehen auf Merck-Agar, ebenso auf Nährstoff-Heyden-Agar — der allerdings weder Fleisch- noch Hefeextrakt enthält — die Kolonien in geringerer Zahl und in kleinerem Umfang auf, als auf Cenovisnährböden und Fleischwassernährböden mit Pepton bzw. mit Kalodal.

Cenovisagar wird in seinem Nährwert durch Peptonzusatz regelmäßig, zum Teil erheblich verbessert; fast ebenso fördernd wirkt Kalodal. Doch ist bemerkenswert, daß der Cenovisagar auch ohne Zugabe von Pepton oder Kalodal nicht weniger, sondern teilweise mehr Kolonien und vielfach größere Kolonien zur Entwicklung bringt als Fleischwasseragar ohne Peptonzusatz.

Das Kalodal kommt nach dem Ergebnis meiner quantitativen Versuche als Ersatz des Peptons in Betracht; für einige Keimarten (Micrococcus roseus, Vibrio Metschnikovii, Corynebact. pseudodiphtheriticum) besitzt es zwar einen deutlich geringeren Nährwert als Pepton, leistet aber im übrigen bei Fleischwasseragar und Cenovisagar durchschnittlich etwa dasselbe, wie Pepton. Es erscheint daher lohnend, das Kalodal weiteren Prüfungen auf seine Brauchbarkeit zu unterziehen. Wie die Chemische Fabrik von Heyden mitteilt, ist sie bereit, 1 kg Kalodal bei direktem Bezug an Institute für 26.— M. abzugeben; 30 g Kalodal würden dann 0,78 RM. kosten.

Den Mangel der Cenovisnährböden, bei manchen farbstoffbildenden Bakterienarten nur eine schwache Farbstoffbildung entstehen zu lassen, suchte ich durch Zugabe von Salzen zu beseitigen. Nach einzelnen Literaturangaben [Kossowicz[1]), Benecke[2])] soll Magnesium die Farbstoffbildung fördern; ebenso seien gewisse Mengen Phosphate erforderlich. Ich versuchte, durch verschieden abgestufte und kombinierte Zusätze von $MgCl_2$, $CaCl_2$, KCl, Na_2HPO_4 die Farbstoffproduktion der in Frage kommenden farbstoffbildenden Bakterienarten zu fördern. Leider hatten meine Versuche nicht den gewünschten Erfolg; es gelang mir nicht, die Farbstoffbildung ausgesprochen und konstant anzuregen. Die verminderte Farbstoffproduktion auf Cenovisnährböden schränkt die Verwendbarkeit des Cenovisextraktes auf jene

1) Kossowicz, Z. f. landw. Versuchsw. Oesterr. Bd. 4. 1907. S. 404.
2) Benecke, Bot. Ztg. Bd. 65. 1907. S. 1.

bakteriologischen Zwecke ein, bei denen die Berücksichtigung des Pigmentes keine Rolle spielt. Immer dann, wenn die Isolierung und Diagnose von Farbstoffbildnern erforderlich ist, müssen Cenovisnährböden außer Betracht bleiben. Ein Nachteil des Cenovisagar ist auch, daß die Schrägagarröhrchen zunächst viel Kondenswasser austreten lassen, um dann nach viel kürzerer Zeit Eintrocknungserscheinungen zu zeigen als Fleischwasseragar.

Nährböden aus dem Merckschen „Standard I“-Pulver haben den Vorzug, daß sie billig und besonders einfach zuzubereiten sind. Für allgemeine diagnostische Zwecke können sie insofern herangezogen werden, als auf ihnen die Farbstoffbildner mit deutlichem Farbenton wachsen, wenn auch die Intensität des Pigmentes meist schwächer als auf Fleischwassernährböden ist. Die Spärlichkeit des Wachstums zahlreicher Bakterienarten wird jedoch bei manchen Verwendungszwecken mehr oder weniger stören.

Schlußfolgerungen.

1) Die aus Fleischwasser mit dem üblichen Zusatz von Pepton Witte bereiteten Nährböden bieten den hygienisch wichtigen Bakterienarten so günstige Wachstumsbedingungen, wie sie keiner der von mir geprüften Ersatznährböden besitzt. — 2) Ein bemerkenswerter Ersatz des Peptons ist das Kalodal, das als 3proz. Zusatz durchschnittlich dasselbe leistet wie Pepton in 1proz. Beigabe. — 3) Das „Standard I“-Nährbodenpulver von Merck kommt als ein Ersatz der Fleischwasserpeptonnährböden in Betracht, ermöglicht aber einer Reihe von Bakterienarten nur ein relativ spärliches Wachstum. — 4) Mit dem Hefepräparat „Cenovis-Extrakt“ an Stelle von Fleischwasser lassen sich Nährböden herstellen, die zusammen mit Pepton bzw. Kalodal, zum Teil auch ohne diesen Zusatz für die meisten Bakterienarten günstige Vermehrungsmöglichkeiten liefern; jedoch ist die Farbstoffbildung vieler Farbstoffbildner auf Cenovisnährböden so vermindert, daß ihre Diagnose erschwert bzw. unmöglich werden kann.

Inhalt.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena — 5375

Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Originale. Bd. 96. Heft 2.

Ausgegeben am 15. September 1925.

Nachdruck verboten.

Ueber die Beeinflussung der Bewegungsgeschwindigkeit von Bakterien.

[Aus der Lehrkanzel für bakteriologische Hygiene der tierärztlichen Hochschule in Wien III (Vorstand: Prof. Dr. Josef Schnürer).]

Von Assistenten Dr. vet. med. **Hans David.**

Ueber die Eigenbewegung der Bakterien liegt eine Reihe von Untersuchungen vor, welche nach Gabritschewsky (1) unter anderem folgende Einzelheiten behandeln:

1) Erscheinungen verschiedener Arten von Empfindlichkeiten (Chemo, Osmo-, Thermotaxis etc.),

2) Art der Bewegung an sich,

3) Dauer und Geschwindigkeit der Bewegungen, abhängig von verschiedenen Bedingungen,

4) Aufhören der aktiven Bewegungen unter dem Einflusse chemischer Faktoren spezifischer Sera etc.

Ich versuchte, Geschwindigkeitsmessungen bei einem beweglichen Bazillus vorzunehmen, der durch verschiedene Bedingungen beeinflußt wurde. Und zwar wurde untersucht, ob und wie durch 1. verschiedene Temperaturen, 2. Serumnährböden und 3. einige Kaliumsalze (Kaliumchlorid und Kaliumnitrit) die Bewegungsintensität desselben geändert würde.

Geschwindigkeitsmessungen bei Bakterien wurden von Gabritschewsky und Liachowetzky (2) vorgenommen, welche die Fortbewegungsgeschwindigkeit der Bakterien nach der Ausbreitungsgeschwindigkeit derselben auf mit Nährstoffen getränktem Filtrierpapier bestimmten.

Carnot und Garnier berechneten die Bewegungsintensität von Keimen aus dem Wege, den diese in mit Sand gefüllten kommunizierenden Röhren in einer bestimmten Zeit zurücklegten. Lehmann und Friede (3) und ebenso Stigell (4) bestimmten dagegen die Bewegungsgeschwindigkeit von Bakterien im „hängenden Tropfen" mittels eines Okularmikrometers, welche Methode auch von mir verwendet wurde.

Da nach den Untersuchungen Matzuschitas, Migulas etc. die einzelnen Bakterienarten zur Entfaltung ihrer Höchstgeschwindigkeit optimale Temperaturen besitzen, wurde vorerst auch das von mir verwendete Stäbchen daraufhin untersucht.

Der Einfluß von Serumnährböden auf die Geschwindigkeit des Stäbchens wurde deshalb untersucht, weil sich in der Literatur verschiedene Ergebnisse über die Wirkung des flüssigen Serums und der mit Serum versetzten Nährböden vorfinden.

Während Danysz finden konnte, daß in Serum, gleichgültig welcher Art, gezüchtete Bakterien frühzeitig ein autolytisches Ferment absondern, konnte Ljachowetzky im spezifischen Serum eine verlangsamte Eigenbewegung feststellte, und Kühnemann (5) nicht nur

dem spezifischen, sondern auch dem nichtspezifischen Serum (von Kaninchen gewonnen) eine tricholytische Wirkung zuschreibt, schlägt andererseits Hibler vor, auf gewöhnlichem Agar gewachsene, unbeweglich vorgefundene Kulturen auf Serumnährböden zu züchten, um dieselben eventuell beweglich zu machen.

Daher lag die Vermutung nahe, daß der Serumzusatz zu einem Nährboden eine Wirkung, sei es nun eine ungünstige oder günstige, auf die Eigenbewegung des Bakteriums ausüben würde.

Weiter wurde die Wirkung von Kaliumsalzen (KCl und KNO_2) auf die Geschwindigkeit des Bakteriums untersucht, weil nach Stigell 1proz. KNO_2 der Bakterienbewegung förderlich sein soll, ebenso wie Pfeffer nach seinen Untersuchungen über chemotaktische Bewegungen den Kaliumsalzen eine besonders gute Reizwirkung zuschreibt.

Nach der Literatur ist das NaCl den Bakterien nicht besonders zuträglich, daher wurde untersucht, ob nicht Kulturen, von nur mit Kaliumsalzen versetztem Nährboden stammend, eine höhere Geschwindigkeit entwickeln würden, als solche, welche in Nährmedien mit einem Kochsalzzusatz gezogen wurden.

Die Untersuchung der verschiedenen Einflüsse sollte hauptsächlich den Zweck verfolgen, die Frage zu entscheiden, ob nicht aus eventuell gefundenen günstigen oder ungünstigen Umständen für die Eigenbewegung des untersuchten Stäbchens allgemeine Anhaltspunkte daraus gezogen werden könnten, wenn es sich darum handelt, unbeweglich gewordene Stämme beweglicher Arten wieder zur Eigenbewegung zu veranlassen, oder selbst eine bisher unbewegliche Art in eine bewegliche umzuwandeln, welche Möglichkeit nach Lehmann als erwiesen zu gelten hat.

I. Methodik. Liachowetzky sprach der Methode. die Geschwindigkeit eines Bakteriums mittels eines Okularmikrometers zu bestimmen, die reale Bedeutung ab, weil seiner Ansicht nach nur einzelne Individuen einer Art zur Beobachtung gelangen können. Nach seiner Methode dagegen (Ausbreitungsgeschwindigkeit der ganzen Bakterienmasse auf Filtrierpapier) können die individuellen Geschwindigkeitsunterschiede von Keimen innerhalb einer Art zu Fehlresultaten keinen Anlaß geben. Die Geschwindigkeit, mit welcher die beweglichen Bakterien sich auf der Oberfläche des Filtrierpapiers fortbewegen, zerfällt in die Geschwindigkeit der Eigenbewegung und aber auch in diejenige der Vermehrung, auf welches störende Moment auch Gabritschewsky hinweist. Da außerdem bei den folgenden Versuchen das Hauptaugenmerk nicht darauf gerichtet war, fixe Zahlen zu gewinnen, sondern um aus dem erhaltenen Zahlenmaterial Schlüsse auf die Wirkung der einzelnen Einflüsse auf die Geschwindigkeit des untersuchten Bakteriums ziehen zu können, wurde zu den Geschwindigkeitsmessungen ein Okularmikrometer verwendet. Als Untersuchungsobjekt diente ein aus einem Bienendarme gezüchtetes, lebhaft bewegliches Stäbchen.

Die Untersuchungen selbst wurden im hängenden Tropfen vorgenommen, wobei sich als beste Stelle, die Eigenbewegung eines Bakteriums quantitativ ohne erhebliche Fehlerquellen messen zu können, diejenige erwies, welche ein Gesichtsfeld vom Rande des Tropfens entfernt lag. Denn einerseits finden sich am Rande des Aërotropismus wegen die meisten Bakterien vor und hindern sich so gegenseitig in ihrer Bewegung, andererseits ist die Beweglichkeit durch die dünne Flüssigkeitsmenge beschränkt.

Nach Einstellung des Tropfens wurde 5 Min. mit der Untersuchung zugewartet, denn es konnte wiederholt die Beobachtung gemacht werden, daß innerhalb dieser Zeit unbewegliche Stäbchen beweglich wurden, oder daß Flüssigkeitsströmungen im Tropfen nach dieser Zeit ausgeglichen sind. Mitunter führten einzelne Bakterien äußerst lebhafte Kreiselbewegungen aus, welche sich dann in eine geradlinige Fortbewegung umwandelten. Diese Kreiselbewegungen dürften auf osmotische Strömungen im Bakterienleib zurückzuführen sein, welche sich später, ohne den Keim sichtlich geschädigt zu haben, ausgleichen (Migula). Die anfängliche Unbeweglichkeit der Bakterien dürfte einesteils auf Konzentrationsunterschiede des Nährbodens und der physiol. NaCl-Lösung, sowie auf Temperaturverschiedenheiten derselben zurückzuführen sein.

Der Weg, den ein Keim zurücklegte, wurde mit dem Reichertschen Schrauben-Mikrometerokular bestimmt (homogene Immersion $^1/_{12}$, Tubuslänge $147^1/_2$ mm).

Bewegte sich ein Stäbchen genau senkrecht zur Mikrometereinteilung, so wurde es so lange beobachtet, als es die gleiche Richtung beibehielt, wobei gleichzeitig Sekunden abgeklopft wurden. Aus jedem hergestellten Präparat wurden 8—10 Einzelwerte bestimmt, und das arithmetische Mittel daraus ergab den Durchschnittswert. Obwohl auf $^1/_{100}$ Min. und $^1/_{10}$ Sek. keine Rücksicht genommen wurde, wurden doch brauchbare Resultate erzielt.

Folgend ein Beispiel einer Geschwindigkeitsmessung:

Zeit in Sekunden	Weg in μ
4	32,5
2	19,5
4	65,0
4	19,5
6	52,0
5	97,5
5	39,0
2	19,5
32	344,5

Da die Geschwindigkeit der Quotient aus Weg und Zeit ist, wäre in diesem Falle die Durchschnittsgeschwindigkeit 10,765 Sekμ.

Konnten durch verschiedene Eingriffe Geschwindigkeitsveränderungen festgestellt werden, so wurden Geißelpräparate angefertigt, um zu sehen, ob die Aenderungen durch morphologische Geißelveränderungen verursacht wurden.

Zur Geißeldarstellung erwies sich am vorteilhaftesten die Färbung von Zettnow gegenüber anderen Methoden, wie: Sichtbarmachung der Geißel im Dunkelfeld oder die Verfahren nach Peppler, Peppler-Zettnow komb., Loeffler und Tribondeau.

I. Einfluß verschiedener Temperaturen.

Um möglichst viel Untersuchungsmaterial zu gewinnen, wurde die Ausgangskultur auf 3 Schrägagar überimpft, 20 Std. bei 37⁰ bebrütet, hernach zwecks Abkühlung der Kulturen, resp. Anwärmung der zur Herstellung des hängenden Tropfens notwendigen physiol. Kochsalzlösung (0,8proz.) auf eine Viertelstunde in den Gelatineschrank bei 18—20⁰ C gegeben, für die höheren Temperaturen ebenso lange in die Fächer der Brutkammer mit entsprechender Temperatur gebracht. Die Tem-

peraturen von 30, 37 und 40° wurden im Nuttallschen Wärmeschrank auf die Präparate einwirken gelassen. Für 18° erfolgte die Untersuchung bei Zimmertemperatur. Da auch auf die Dauer der Wärmeeinwirkung Rücksicht genommen wurde, wurden die Geschwindigkeitswerte nach 5, 15, 30, 45, 90 Min. und länger währendem Aufenthalte im „Nuttall" bestimmt. Um möglichst genaue Durchschnittszahlen zu erhalten, wurde jeder Kultur von 3 Stellen Material entnommen, von jeder Stelle aus 8—10 Einzelwerten die Durchschnittsgeschwindigkeit ermittelt und aus sämtlichen erhaltenen Werten erst ein Gesamtdurchschnittswert für die betreffende Kultur ausgerechnet, wobei unberücksichtigt blieb, daß einzelne Stäbchen stillagen. Mithin besteht jeder ermittelte Geschwindigkeitswert für eine Kultur aus 24—30 Weg-Zeitbestimmungen. Die untersuchte Bakterienmenge wurde stets dem Kondenswasser oder dem tiefstgelegenen Teile entnommen, weil sich an diesen Stellen die beweglichsten Bakterien vorfinden. Wie diesbezügliche Messungen ergaben, differierten die Werte je nach dem Teile der Kultur, welchem die Keime entstammten, um 6, 8 und mehr Sekμ. Bei 18° C lag ein Großteil der Stäbchen kurz nach Beimpfung des hängenden Tropfens still. Erst nach 8—10 Min. wurden die Bakterienbewegungen regelmäßiger, und es konnte eine Durchschnittsgeschwindigkeit von 10,1 Sekμ festgestellt werden. Im weiteren Verlaufe wurden die Geschwindigkeit immer intensiver, bis sie nach einer Gesamtbeobachtungsdauer von 30 Min. ihr Maximum im Ausmaße von 15,28 Sekμ erreichte. Nach dieser Zeit trat wieder eine Verlangsamung der Fortbewegung ein, es konnten aber noch nach 3 Std. viele Stäbchen beweglich vorgefunden werden.

Bei 30° fiel ebenfalls die anfängliche Geißelstarre auf, welche aber schon nach 5 Min. gelöst war. Für diese Temperatur wurden folgende Geschwindigkeitswerte gefunden.

Beobachtungsdauer in Minuten	Mittelwert in Sekunden
5	10,73
10	16,9
30	20,52
45	20,32
60	18,14
90	12,75
4 Std.	3,73

Bei 37° C war schon nach 1—2 Min. die lebhafteste Bewegung zu bemerken, welche sich in weiteren 10 Min. von 14,41 Sekμ auf 17,89 Sekμ steigerte. Nach dieser Zeit fiel die Geschwindigkeit zuerst langsam (nach 30 Min. .... 15,64 Sekμ), dann rapider (nach 45 Min. .... 9,23 Sekμ, 60 Min. .... 4,18 Sekμ), so daß nach 90 Min. fast sämtliche Stäbchen stillagen.

In den bei 40° C untersuchten Präparaten konnten 1 Min. nach Beimpfung des Tropfens sämtliche Stäbchen in lebhaftester Bewegung vorgefunden und eine Geschwindigkeit von durchschnittlich 16,4 Sekμ festgestellt werden. Im Verlaufe von 10 Min. ließ die Bewegung deutlich nach, so daß die nach 30 Min. vorgenommene Geschwindigkeitsmessung nur mehr 6,56 Sekμ ergab und nach einer Gesamtbeobachtungsdauer von 45 Min. in den Präparaten vollständige Ruhe eingetreten war. Ziffernmäßig ließen sich die vorangeführten Versuche in folgender Weise ausdrücken:

Beobachtungs-temperatur	Regelmäßige Bewegungen nach Minuten	Anfangs-geschwindigkeit in Sekunden	Höchst-geschwindigkeit in Sekunden	Erreicht in Min.	Geschwindig-keitsabfall nach Min. Beobachtungs-dauer
18° C	10	10,1	15,25	30	35
30° C	5	10,73	20,53	30	45
37° C	1—2	14,41	17,89	10	15
30° C	sofort	16,42	16,42	.	5

Zusammenfassend kann aus den Versuchen geschlossen werden, daß die höhere Temperatur eine größere Anfangsgeschwindigkeit des untersuchten Bakteriums bedingte, und um so früher löste sich auch die anfängliche Geißelstarre. Weiter bewirkten die verschieden hohen Temperaturen verschieden hohe Geschwindigkeitswerte, ebenso wie der Abfall der Geschwindigkeit von der Temperatur abhängig war.

Würde man als optimale Temperatur für die Eigenbewegung eines Bakteriums diejenige bezeichnen, welche die größte Geschwindigkeit vermittelt (von einer plötzlichen Reizwirkung abgesehen), ohne den Keim wesentlich zu schädigen, so wäre sie für das untersuchte Stäbchen 30° gewesen. Die Geschwindigkeit stieg um 10 Sekμ gegenüber der Anfangsgeschwindigkeit, außerdem schädigten 30° das Bakterium so wenig, daß es einesteils seine maximale Geschwindigkeit durch 15 Min. beibehielt und anderenteils selbst nach 4 Std. noch viele bewegliche Stäbchen in den Präparaten vorgefunden wurden. Es darf aber der Umstand nicht außer acht gelassen werden, daß die nach 4 Std. beweglich vorgefundenen Bakterien vielleicht nicht mehr die alten, sondern neue, durch Spaltung entstandene, waren.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Beweglichkeit der Bakterien nicht wie bisher bei einer bestimmten, sondern bei langsam ansteigenden Temperaturen untersucht. Zu diesem Zwecke wurde das Präparat in den auf Zimmertemperatur (18°) erkalteten Wärmeschrank gebracht, dieser mit einem Bunsenbrenner, der mitunter gedrosselt wurde, angeheizt, nach je 10 Min. die Temperaturen abgelesen und die Geschwindigkeitsmessungen vorgenommen. Wie früher, fiel auch in diesem Falle die unregelmäßige Beweglichkeit der Keime in den ersten 5 Min. auf, welche aber in weiteren 10 Min., als bereits 20° erreicht waren, zu einer regelmäßigen und immer intensiveren wurde. Um 30° begannen sich einige bis dahin am Rande des Tropfens unbeweglich liegende Bakterien von diesem loszulösen, was mit dem Ansteigen der Temperatur von immer mehr Stäbchen geschah, so daß bei 35° die Bakterien des ganzen Tropfenrandes in lebhaftester Bewegung waren. Hie und da konnte an gewissen Stellen des Randes eine Bakterienansammlung bemerkt werden, welche ungefähr 10 Sek. andauerte Dies machte den Eindruck, als ob die Keime sich mit Luft versorgen würden, um dann äußerst eilig wieder der Tropfenmitte zuzustreben. Dieser Vorgang konnte immer um 30° beobachtet werden. Bei 42° und mehr waren nur sehr wenige unbewegliche Bakterien am Tropfenrande angesammelt, der Großteil befand sich an der tiefsten Stelle der Tropfenmitte. Auch bei diesen Versuchen wurden die Höchstwerte der Geschwindigkeit bei Temperaturen erreicht, welche zwischen 30 und 34° lagen, ebenso wie der optimale Wärmegrad bei den ersten Versuchen um 30° C gelegen war. Das weitere Ansteigen der Temperatur über

34° bewirkte in jedem Falle einen rapiden Geschwindigkeitsabfall, obwohl bei diesen Untersuchungen trotz der langen Beobachtungszeit auch bei 40—44° C viele Bakterien beweglich vorgefunden wurden, im Vergleiche zu den massenhaft unbeweglich gewordenen, wie sie bei der sofortigen Einwirkung bei 40° schon nach 30 Min. gesehen wurden. Diese Erscheinung dürfte vielleicht darauf zurückzuführen sein, daß die hohen Temperaturen verhältnismäßig langsam erreicht wurden und die Bakterien Zeit fanden, sich an dieselben zu gewöhnen.

Aus den vorangeführten Versuchen könnte über den Einfluß der Temperatur für das untersuchte Stäbchen folgendes gelten:

1) Die Schnelligkeit der Bewegung war von der Temperatur abhängig. — 2) Niedere Temperaturen verursachten einen langsamen Geschwindigkeitsanstieg und ein langsames Abfallen derselben, hohe ein rasches Steigen und rapides Fallen der Bewegungsintensität. — 3) Temperaturen nahe von 30° waren für die Schnelligkeit des untersuchten Stäbchens die besten. — 4) Temperaturen über 44° C bewirkten eine rasch eintretende Geißelstarre, die Keime selbst blieben aber vermehrungsfähig, denn solche, aus dem hängenden Tropfen auf Agar übertragen, wuchsen zu Kulturen aus.

II. Einfluß der Serumnährböden.

Zu diesen Untersuchungen wurde das zu den ersten Versuchen verwendete Stäbchen auf 10proz. Serumagar gezüchtet. Dieser sowie der zugehörende Kontrollnährboden, d. i. gewöhnlicher Nähragar ohne Serumzusatz, wurde auf Vorrat hergestellt. Jeden Tag durch 2 Wochen hindurch wurden die „Serumkulturen“ und „Kontrollkulturen“ auf 3 Serumagar und 3 Kontrollagar überimpft und 20 Std. bei 37° C bebrütet. Die Untersuchungsmethodik war die gleiche wie bei der 1. Versuchsreihe.

Wie aus den gefundenen Zahlenwerten ersehen werden konnte, erfolgte bei den Serumkulturen in den ersten 3 Tagen ein Geschwindigkeitsabfall um beiläufig 4 Sekμ, was gegenüber einer Anfangsgeschwindigkeit von ca. 10 Sekμ eine beträchtliche Verlangsamung der Bakterienbewegung bedeutete. Die Geschwindigkeit der Kontrollkulturen fiel hingegen in derselben Zeit nur um beiläufig 0,5 Sekμ. Nach dem 4. Tage jedoch nahm die Bewegungsintensität der Serumkulturen bis zum 7. Tage wieder zu und erreichte schließlich eine Geschwindigkeit von 9,3 Sekμ, das ist beiläufig die Anfangsgeschwindigkeit.

Daß bei plötzlichem Nährbodenwechsel sich Bakterien morphologisch und biologisch ändern können, welche Aenderung später durch Anpassung der Keime an das fremde Kulturmedium wieder aufgehoben wird, wird in der Literatur oft erwähnt. Für Serum im speziellen versucht A. Fischer als Gegner der Buchnerschen Alexintheorie nachzuweisen, daß Bakterien, welche auf den üblichen peptonhaltigen Nährböden gezüchtet wurden, im frischen Serum so lange in einen Hungerzustand versetzt wurden, bis sie die nötigen Mengen proteolytischer Fermente gebildet haben, um das neue Nährmedium ausnützen zu können. Baumgarten fand ähnliches für erhitztes Serum (55° C), obwohl es für viele, aber nicht für alle Bakterien (Artverschiedenheiten!), ein durch die Erwärmung besserer Nährboden wurde. Wenn auch diese Theorien für flüssiges Serum aufgestellt wurden, könnte vielleicht gleiches für den mit Serum versetzten Nährboden gelten und den anfänglichen Geschwindigkeitsabfall der Kulturen verursacht haben!

Aus dem Geschwindigkeitsanstieg nach dem 4. Tage könnte auf die erfolgte Anpassung der Keime an den Nährboden geschlossen werden.

Für die anfängliche Geschwindigkeitshemmung kann vielleicht noch ein zweiter Faktor in Betracht kommen.

Zur Herstellung der Serumnährböden wurde Serum verwendet, das aus einem Gefäße stammte, dessen Verschluß mit Schimmelpilzen verunreinigt war. Nach der Filtration durch ein „Reichel-Filter" war es zwar „schimmelfrei", aber während der Filtration durch ein, dem Bac. subtilis ähnliches Stäbchen verunreinigt worden. Daher wurde dieses Serum durch 6 Tage hindurch bei 56° C fraktioniert sterilisiert. Sirotini und Bitter konnten in Bakterienkulturen jeder Art bakterientötende Substanzen nachweisen, die von den Keimen selbst abgeschieden wurden und die nach Kruse und Passini in vielen Fällen koktostabil waren. Aehnliche Hemmungsstoffe auf das Bakterienwachstum wies auch Friede in bereits verwendetem Subtilis-Agar nach, die sich als nicht spezifisch wirkend erwiesen. Vielleicht sonderte nun das Stäbchen, welches das Serum infizierte, ähnliche Stoffe ab, welche an dem untersuchten Stäbchen den anfänglichen Geschwindigkeitsabfall bewirkten, bis sich die Keime der Giftwirkung angepaßt hatten und ihre Geschwindigkeit wieder anstieg.

In dem Wiederansteigen der Geschwindigkeiten des Bakteriums am 5., 6. und 7. Tage war schon ein Unterschied zwischen den Serum- und Kontrollkulturen zu ersehen, da letztere vom ersten Tage an ein langsames, aber fortwährendes Absinken ihrer Bewegungsintensität zeigten. (Wie eingangs erwähnt wurde, wurden die Nährböden auf Vorrat hergestellt.) Erst nach dem 7. Tage fiel die Geschwindigkeit der Serumkulturen rapid, was einer stark austrocknenden Wirkung des Serumzusatzes zugeschrieben werden mußte. Die Austrocknung äußerte sich aber nicht nur in dem rapiden Abnehmen der Bewegungsintensität und in den einzelnen Geschwindigkeitsschwankungen der einzelnen Kulturen, sondern auch durch Veränderungen am Nährboden selbst und an den darauf gewachsenen Kulturen.

Beim Vergleiche der einzelnen Nährbodenröhrchen konnte oftmals die Beobachtung gemacht werden, daß die ungebrauchten Serumnährböden nach 3- bis 4tagelangem Aufbewahren bedeutend weniger Kondenswasser enthielten, wie die gleichalten Agarkontrollen. Nach 6—7 Tagen zur Verwendung kommende, mit Serum versetzte Nährböden waren zum Unterschiede von den Agarkontrollen nach der 20stünd. Bebrütung vielfach zerrissen und die Kulturen sehr spärlich gewachsen. Um festzustellen, ob der Serumzusatz zu den Nährböden eine morphologische Veränderung des Geißelapparates verursachte, wurden fortlaufend Geißelpräparate angefertigt. Eine Aenderung der Geißel konnte nie beobachtet werden. Mitunter trat zwar ein Körnigwerden derselben ein, was aber als ein Kunstprodukt zu deuten war. Denn diese Erscheinung konnte nur gesehen werden, wenn die Präparate mit der Silberlösung stark geschwärzt wurden, blieb aber aus, wenn sie nur gebräunt erschienen.

Weitgehende Aenderungen der Geißel konnten jedoch bei trockenen Kulturen beobachtet werden. An Stelle der ansonsten sinuslinienähnlichen, gleichmäßig langen Geißel waren feine, lange Fäden zu bemerken, welche mitunter ein Stäbchen mit einem anderen netzartig verbanden oder ein Filzwerk bildend, strahlenkranzartig von einem Bak-

terienklumpen ausgingen. Diese eigenartige Fadenbildung, die von Migula als Pseudogeißeln, von Zettnow (6) als Schleimgeißeln bezeichnet wurden, behandelte Hinterberger (7—9) eingehend in einer Reihe von Arbeiten. Er stellte diese Faden an einer Reihe von Bakterienarten durch Züchtung in trockenen Nährböden her und erklärt sie damit, daß geißeltragende Bakterien auf trockenen, nährstoffreichen Kulturmedien ihre Bewegungsorgane in Wurzeln umwandeln, womit sie sich die Nährstoffe herausholen. Hinterberger bezeichnet diese Faden als „Mycele".

Daß aber Austrocknung der Nährböden nicht die alleinige Ursache dieser fraglichen Fadenbildung ist, könnte daraus ersehen werden, daß ich dieselben an dem Großteil der Stäbchen einer Kultur vom Bact. coli beobachten konnte, welche in einem mit einer KCL-Lösung versetzten Agar gezogen wurden, der durch einen Flüssigkeitsüberschuß auch nach dem Erkalten nicht fest wurde.

Aus den vorangeführten Versuchen konnte aus dem Ansteigen der Geschwindigkeiten vom 4. bis zum 7. Tage die günstige Wirkung des Serumzusatzes zum Nährboden ersehen werden. Dagegen konnte aus dem rapiden Geschwindigkeitsabfall nach dem 7. Tage und den Veränderungen der dort längere Zeit aufbewahrten Nährböden auf die stark austrocknende Wirkung des Serums geschlossen werden. Diese gewissermaßen ungünstige Wirkung des Serums konnte durch einen Flüssigkeitszuschuß zu den Nährböden teilweise beseitigt werden.

Zu diesem Zwecke wurde ein 10proz. Serumagar verwendet, dem zur Vermehrung seines Kondenswassers nach dem Erkalten 0,2 ccm 10proz. Serumbouillon zugegeben wurde. Für die Kontrollen wurde gewöhnlicher Agar mit einem Zusatz von 0,2 ccm Bouillon hergestellt. Zunächst wurden je 3 Röhrchen beimpft, 20 Std. bebrütet, hernach die Geschwindigkeiten bestimmt. Diese Kulturen wurden dann in den Gelatineschrank gebracht und täglich nach 20 Std. die Messungen vorgenommen. Es wurde also mit Dauerkulturen gearbeitet. Während sich die Geschwindigkeiten der Kontrollen bis zum 7. Tage annähernd in der gleichen Höhe hielten, um später mehr oder weniger steil abzufallen, was auch Migula und Gotschlich an alten Kulturen feststellten und auf Nährbodenerschöpfung und giftige Stoffwechselprodukte zurückführen, zeigten die Geschwindigkeiten der Serumkulturen ein anderes Verhalten. Nach einer Anfangsgeschwindigkeit der Serumkulturen von 8,62 Sekμ sank die Bewegungsintensität in den ersten 4 Tagen auf 7,74, 7,38, 7,37 Sekμ, um vom 5. Tage bis zum 12. auf 10,17 Sekμ anzusteigen. In diesen 12 Tage alten Kulturen waren mithin die Geschwindigkeiten höher als die Anfangsgeschwindigkeit. Nach dem 12. Tage sank die Bewegungsintensität der Serumkulturen bedeutend steiler ab als die der Kontrollkulturen, so daß nach 2 Monaten die wenigen noch beweglich gefundenen Stäbchen der Agarkulturen eine größere Geschwindigkeit besaßen als die der Serumkulturen.

Wie die angestellten Versuche zeigten, hatte der Serumzusatz zum Nährboden eine günstige Wirkung auf die Bewegungsintensität des untersuchten Stäbchens, und es könnten mithin folgende Schlüsse gezogen werden:

1) Serumagar trocknet leichter aus als ein gewöhnlicher Agarnährboden. Diese Austrocknung kann durch einen Zusatz von Serumbouillon zum Kondenswasser hinausgeschoben werden. — 2) Der Uebergang vom gewöhnlichen auf den Serumagar bewirkte bei dem unter-

suchten Stäbchen eine Hemmung der Geschwindigkeit. — 3) Der Serumzusatz verursachte nur durch die von ihm hervorgerufene Eintrocknung der Kultur eine Aenderung der Geißelanlage, eine Auflösung der Geißel bewirkte er nicht. — 4) Im Gegensatze zu gewöhnlichen Agarkulturen konnte in den gleichaltrigen Serumkulturen nach Tagen eine Steigerung der Geschwindigkeit festgestellt werden.

III. Einfluß von Kaliumsalzen.

Zu den folgenden Untersuchungen wurden Bouillonkulturen genommen. Die Bouillon, hergestellt aus Hühnerfleisch und 1 Proz. Pepton, wurde in 2 Teile geteilt und einer mit 0,6proz. KCl und der andere mit 0,6proz. NaCl versetzt, wobei auf die bereits in Bouillon befindlichen Salze (Fleischsalze etc.) keine Rücksicht genommen wurde. Die zu den Versuchen verwendeten Salze waren chemisch rein.

Je 3 Bouillonröhrchen mit den verschiedenen Salzzusätzen wurden von der Stammkultur aus beimpft und die 20stünd. bei 37° C gezüchteten Kulturen im hängenden Tropfen vorerst ohne jedweden Zusatz auf Geschwindigkeit untersucht. Die meisten Stäbchen der Bouillonkulturen waren zu sehr langen Fäden ausgewachsen, manche bis 80 μ und noch länger. Infolgedessen konnte eine Geschwindigkeitsmessung nur mit den kurz verbliebenen Stäbchen vorgenommen werden, da die Faden höchstens pendelnde Bewegungen ausführten. Die Bewegungsintensität der Bakterien von der Kultur mit NaCl oder KCl stammend, war ziemlich die gleiche und schwankte zwischen 9 und 12 Sek/μ. In keinem Falle konnte ein bedeutender Geschwindigkeitsunterschied beobachtet werden. Sehr auffallend war jedoch das rasche Unbeweglichwerden der „KCl-Kulturen". Während die „NaCl-Kulturen" ihre Bewegungen nach ca. 15 Min. einstellten, geschah dies bei den „KCl-Kulturen" schon nach 5 Min., welcher Umstand nur dem Kaliumchlorid zugeschrieben werden konnte.

Herbst und Loeb (10) konnten durch Versuche an Fisch- resp. Seeigeleiern feststellen, daß zur Reifung und Entwicklung derselben NaCl, KCl und $CaCl_2$ notwendig wären und Natriumchlorid für sich allein giftig wirke. Gammarue konnte allgemein finden, daß NaCl von Kalium- und Kalziumsalzen zwar entgiftet würde, daß aber die beiden letztgenannten Salze ebenfalls schädlich auf Organismen einwirken, wenn die Kochsalzkonzentration in einer Nährlösung verringert wird.

Das Unbeweglichwerden der Bakterien in der KCl-Bouillon könnte mithin darauf zurückzuführen sein, daß das Chlorkalium in einer derartigen Konzentration darin enthalten war, daß die geringe Menge von Kochsalz, welche nur als chemische Verunreinigung durch die einzelnen Bestandteile der Nährstoffe hineingelangte, nicht genügte, um es zu entgiften. Andererseits finden sich in der gewöhnlichen Bouillon so viele Mengen von Kalziumsalzen vor, welche teils von den Nährstoffen und teils aus dem Glase stammen, daß der Kochsalzzusatz zu dem Nährboden (0,6 Proz.) nicht erheblich giftig wirken kann. Es wurde daher untersucht, ob der Beweglichkeitsunterschied der Kultur tatsächlich auf die Kaliumwirkung zurückzuführen ist.

Zu diesem Zwecke wurde zu einem hängenden Tropfen (aus einer „KCl-Kultur" hergestellt), wenn darinnen die Bakterien unbeweglich geworden waren, was stets nach 5—7 Min. zu beobachten war, eine Oese Kochsalzlösung gegeben (0,6proz.). Schon nach ganz kurzer

Zeit begannen sich einige Stäbchen von neuem zu bewegen, welche Bewegung immer intensiver und manchmal sogar stürmisch wurde. Selbst sehr lange Faden bewegten sich von der Stelle. Während die Geschwindigkeit der „KCl-Kulturen" ohne NaCl-Zusatz beiläufig 7,65 Sekμ betrug, konnte nach Zusatz der Kochsalzlösung eine solche von 14,9 Sekμ festgestellt werden. Mithin war der Geschwindigkeitsanstieg 7,75 Sekμ oder die Bakterienbewegung wurde nach dem Kochsalzzusatz fast um das Doppelte schneller. In solchen Präparaten konnten auch noch nach einer halben Stunde bewegliche Bakterien gefunden werden.

Wie hoch die Geschwindigkeiten steigen, zeigen einige Zahlen:

Geschwindigkeit der KCl-Kulturen in Sekunden ohne NaCl	mit NaCl	Ansteigen in Sekμ
7,79	12,8	5,01
8,4	17,79	9,39
8,39	14,72	6,33
7,63	15,47	7,84
5,85	13,31	7,76

Analog wurden hängende Tropfen aus „NaCl-Kulturen" hergestellt und zu diesem eine Oese 0,6proz. KCl-Lösung gegeben. Es konnte aber weder ein Wiederbeweglichwerden der Bakterien noch eine bedeutende Steigerung der Geschwindigkeit beobachtet werden, ebenso nicht, wenn statt Kaliumchlorid eine 1proz. KNO_2-Lösung einwirken gelassen wurde.

KNO_2 bewirkte auch bei Agarkulturen keine wesentliche Steigerung der Fortbewegungsgeschwindigkeit. Manchmal konnte eine solche zwar festgestellt werden, die aber höchstens 2—4 Sekμ betrug.

Wie aus den angeführten Untersuchungen ersehen werden kann, bewirkte der Zusatz von Kaliumsalzen zu „NaCl-Kulturen" keine wesentliche Geschwindigkeitssteigerung. Die Intensität der Bewegung wurde jedoch stets höher, wenn zu „KCl-Kulturen" physiologische Kochsalzlösung gegeben wurde. Ohne diesen Zusatz blieb sowohl die Geschwindigkeit als auch die Dauer der Bewegung gering. Es liegt infolgedessen die Vermutung nahe, daß das untersuchte Bakterium zur Entfaltung seiner Beweglichkeit Kochsalz in seinem Nährboden benötigt.

Daß aber auch das Kaliumsalz eine günstige Wirkung für die Eigenbewegung des Bakteriums hatte, kann daraus ersehen werden, daß die Geschwindigkeitswerte der „KCl-Kulturen" nach dem Kochsalzzusatz stets höher waren, wie die der „Natriumchloridkulturen" mit oder ohne weiteren Zusatz von Kaliumchloridlösung oder physiologischer Kochsalzlösung, letztere zur eventuellen Verdünnung der Bouillon.

Es würde sich nun die Frage ergeben, ob es nicht überhaupt besser wäre, in Kulturmedien sämtliche Salze zu geben, welche nach der diesbezüglichen Literatur die Keime besonders bevorzugen. Dies wären nach Benecke, Lafar etc. Natrium, Kalium, Kalzium und Magnesiumsalze und mit diesen, welche in der Ringerschen Lösung teilweise enthalten sind, die Nährböden, statt des alleinigen Zusatzes von NaCl zu versetzen.

Anschließend sei noch eine wiederholt bemerkte Erscheinung erwähnt, daß die Bewegung der auf Agar gezogenen Keime, gleichgültig von welcher Stelle das Untersuchungsmaterial stammte, ausgenommen stark eingetrockneter Bakterienrasen, stets eine lebhaftere und länger andauernde war wie die von gleichaltrigen, unter denselben Bedingungen untersuchten Bouillonkulturen, obwohl nach vielen Autoren frisch hergestellte flüssige Nährböden die Bakterien günstiger beeinflussen wie feste.

Aus den vorstehenden Untersuchungsergebnissen kann ersehen werden, daß die Geschwindigkeit des untersuchten Bakteriums durch die verschiedenen Einflüsse, wie: verschieden hohe Temperaturen, Serumnährböden und Kaliumsalze, verändert wurde.

I. Die Zimmertemperatur war der Geschwindigkeit des untersuchten Stäbchens nicht so günstig wie 30°, aber vorteilhafter wie 37° und 40° C, welche Temperaturen nach einer anscheinend anfänglichen Reizwirkung das Bakterium bald schädigten, ohne es abzutöten. — II. Ebenso konnte gezeigt werden, daß die mit einem Flüssigkeitszuschuß zur Verhinderung der Austrocknung versehenen Serumnährböden nach einem anfänglichen Abfall der Geschwindigkeit fördernd auf dieselbe einwirkten. — III. KCl allein hemmt an und für sich rasch und bleibend die Beweglichkeit des Bakteriums. Erst nach dem Zusatze von NaCl konnte die günstige Wirkung des KCl wahrgenommen werden. Das NaCl scheint aber der Geschwindigkeitsentfaltung des Bakteriums notwendiger zu sein als KCl. — IV. Wenn man auch diese Feststellungen, sowie die im Laufe der Untersuchung beobachteten günstigen oder ungünstigen Momente für die Eigenbewegung des verwendeten Stäbchens nicht verallgemeinern kann, könnten doch einige allgemein geltende Anhaltspunkte für die Untersuchung anderer Bakterienarten daraus gezogen werden, wenn deren Bewegungsfähigkeit zweifelhaft, erloschen oder noch nicht festgestellt ist.

1) Züchten auf stets frisch bereiteten Nährböden. — 2) Züchten auf festen und in flüssigen Nährmedien, mit und ohne Serumzusatz. Bakteriell verunreinigtes, wenn auch durch fraktionierte Sterilisation sterilisiertes Serum wäre nicht als Zusatz zu verwenden. — 3) Stundenlanges Aufbewahren des hängenden Tropfens und zeitweiliges Untersuchen desselben. — 4) Beobachtung bei verschieden hohen als auch bei ansteigenden Temperaturen. — 5) Untersuchung vieler, verschiedenaltriger Kulturen von wenigen Stunden bis tagealten. — 6) Wäre es vielleicht besser, die Nährmedien statt mit Kochsalz mit den Salzen der Ringerschen Lösung, d. s. NaCl, KCl, $CaCl_2$ und einem Magnesiumsalz zu versetzen. — 7) Ortsveränderungen einzelner Keime sind deswegen gut mit einem Okularmikrometer zu beobachten, weil man durch die Skaleneinteilung einen Anhaltspunkt hat, ob das Bakterium die Brownsche Molekular- oder eine selbständige Bewegung ausführt, dies namentlich dann, wenn die Bakterien sehr träge beweglich sind und Strecken, welche nur wenige μ betragen, zurücklegen.

Literaturverzeichnis.

1) Gabritschewsky, Ueber aktive Beweglichkeit der Bakterien. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 35.) — 2) Liachowetzky, Neue Methode zum Studium der lokomotorischen Funktion der Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 57.) — 3) Lehmann und Friede, Beobachtung über die Eigenbewegung der Bakterien. (Ztschr. f. Hyg. Bd. 46.) — 4) Stigell, Ueber die Fortbewegungsgeschwindigkeit und Bewegungskurven. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 45.) — 5) Kühnemann, Veränderung der Geißel bei der Agglutination. (Ebendas. Bd. 84.) — 6) Zettnow, Ueber Schleimgeißeln. (Ztschr. f. Hyg. Bd. 86.) — 7) Hinterberger, Einiges zur Morphologie der Milzbrandbazillen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 40.) — 8) Ders., Geißeln und Mycele unter der Einwirkung der Wärme. (Ebendas. Bd. 86.) — 9) Ders. und Reitmann, Verschiedenes Wachstum des Bac. pyocyaneus. (Ebendas. Bd. 37.) — 10) Zit. Eisler, Ueber Wirkungen von Salzen auf Bakterien. (Ebendas. Bd. 51.)

Nachdruck verboten.

Vorversuche zur Züchtung der Tuberkelbazillen und säurefesten Saprophyten im Auswurfe.

[Reichslaboratorium für Bakteriologie und Chemie. Krankenhaus des Ukrainischen Roten Kreuzes.]

Von Dr. J. **Schiller** aus Odessa.

In einer ganzen Reihe von Arbeiten, betitelt „Ueber erzwungene Antagonisten"[1]) haben wir nachgewiesen, daß es möglich ist, für 2 Bakterienarten, die sich im gewöhnlichen Milieu gut vertragen, solche Bedingungen zu schaffen, daß zwischen ihnen ein Existenzkampf entsteht und eine der anderen zum Opfer fällt, indem sie von ihr verdaut wird. Dasselbe Prinzip sollten wir in bezug auf den Auswurf der Tuberkulosekranken verwerten, und zwar in denjenigen Fällen, wo die üblichen Methoden (Homogenisierung) versagten. Anders gesagt, unser Ziel war, die einzelnen übersehenen Tuberkelbazillen dazu zu veranlassen, daß sie die sie begleitenden Bakterien verdauen und auf ihre Kosten zur Entwicklung gelangen. Wir stießen aber sofort auf Schwierigkeiten, weil die Verhältnisse im Auswurfe nicht dieselben sind wie in denjenigen Nährböden, die wir in unseren oben erwähnten Versuchen benutzten.

1) Bei den Versuchen mit erzwungenen Antagonisten handelt es sich immer um 2 bestimmte Mikroorganismen, dagegen haben wir es im Auswurfe mit einer großen Zahl derselben zu tun.

2) Zur Erzielung von erzwungenen Antagonisten ist immer ein chemisch definiertes Milieu notwendig, dagegen ändert sich das Milieu im Auswurfe von Fall zu Fall und

3) Bei den Antagonistenversuchen handelt es sich um schnellwachsende Bakterien, dagegen entwickelt sich der Tuberkelbazillus sehr langsam. Dieses Moment bietet besondere Schwierigkeiten in bezug auf die Anwendung des Prinzips des erzwungenen Antagonismus auf die Untersuchung des Auswurfes der Tuberkulösen.

A. Distaso und J. Schiller[2]) konnten nachweisen, daß es möglich ist, im chemisch undefinierten Milieu im Dickdarme der weißen Ratten solche Bedingungen zu schaffen, daß eine einzige Bakterienart (Bacillus bifidus) die Oberhand über die anderen gewinnt und fast zu einer reinen Kultur (auf dem Präparate) gelangt.

Später ist es anderen Autoren gelungen, dasselbe Resultat auch im Dickdarme von Kindern zu erzielen. Diese Versuche interessieren hier nur deswegen, weil sie zeigen, daß es möglich ist, in einem uns ganz unbekannten Milieu (im Dickdarme) in Gegenwart einer Unmenge von Bakterien solche Bedingungen zu schaffen, daß eine fast reine Kultur einer Bakterienart zum Vorscheine kommt. (Den Mechanismus dieser Erscheinung betrachten wir als erzwungenen Antagonismus in vivo.)

In unseren Versuchen mit Auswürfen sind wir annähernd zu denselben Resultaten gekommen. Wegen des langsamen Wachstums der

---

1) J. Schiller, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 91. 1923; Bd. 92. 1924; Bd. 94. 1924.

2) A. Distaso et J. Schiller, Sur la transformation de la flore intestinale. (Compt. Rend. Soc. de Biol. 1914. Nr. 4; 1914. Nr. 6; 1915. T. 68).

Tuberkelbazillen mußten wir unsere Aufgabe beschränken und das Hauptgewicht darauf legen, daß die Tuberkelbazillen ungestört von anderen Bakterien ungefähr in demselben Tempo wie in den üblichen Milieus zur Entwicklung gelangen. — Bekanntlich können die Tuberkelbazillen im Gegensatz zu den meisten Bakterien sich sehr gut in konzentrierten Glyzerinlösungen entwickeln. Diejenigen wenigen Bakterienarten, welche in Glyzerin gedeihen, bieten nur dann eine Gefahr für die Tuberkelbazillen, wenn sie zu den Fäulnisbakterien gehören, aber bekanntlich lassen sich die Fäulniserscheinungen leicht beseitigen[1]).

Wir verfuhren in folgender Weise: Wir setzten zum Auswurfe ein gleiches Volumen von 75proz. Glyzerin und eine kleine Quantität von Glukose zu[2]). Der Auswurf verbleibt 24 Std. im Brutschranke bei 37° C, nach dieser Zeit gelangt er zur Untersuchung. Zuerst wurde er vom Glyzerin befreit und dann in üblicher Weise gefärbt. Dabei ist zu bemerken, daß auch nach sorgfältigem Waschen das Glyzerin an dem Auswurfe haften bleibt, deswegen bietet die Färbung große Schwierigkeiten. Die Karbolfuchsinlösung muß 3—4mal bis zum Evaporieren erwärmt werden und das Entfärben womöglich mit schwacher Säurelösung vorgenommen werden.

Es wurden, wie wir oben sagten, nur diejenigen Auswürfe untersucht, in welchen wir nach den üblichen Homogenisierungsmethoden keine Tuberkelbazillen nachweisen konnten. Aber bevor wir solche Auswürfe untersuchten, mußten wir feststellen: 1) wie schnell die Entwicklung der Tuberkelbazillen vor sich geht und 2) ob diese Entwicklung keine temporäre ist, d. h., ob sie schließlich nicht durch das Wachstum anderer Bakterien paralysiert werde. Zu diesem Zwecke untersuchten wir zuerst die Auswürfe, in welchen sehr wenig Tuberkelbazillen nachgewiesen wurden, und dann verfolgten wir die Entwicklung derselben während 1—2 Monaten.

Fall 1. M. G. Bei Anwendung des Homogenisierungsverfahrens haben wir 3,6 : 1 Tuberkelbazillen gefunden. Nach 24 Std. fanden wir bei Anwendung unserer Methode 29,3 : 1. Nach 1 Woche 45—80—85 : 1, nach 1 Monat 85—120 : 1, nach 2 Monaten blieb diese Zahl unverändert.

Fall 2. S. D. Nach dem Homogenisierungsverfahren sind 11 : 3 Bazillen nachgewiesen worden. Nach 48 Std. ergab unsere Methode 3 : 1 Bazillen, nach 9 Tagen 25,7 : 1, nach 30 Tagen 42 : 1 Bazillen.

Fall 3. L. S. Nach dem Homogenisierungsverfahren 3 : 1, nach 48 Std. (unser Verfahren) 9 : 1, nach 30 Tagen 72,3 : 1.

Fall 4. O. K. Nach dem Homogenisierungsverfahren 2,6 : 3, nach 48 Std. 3 : 1 (unser Verfahren), nach 2 Monaten 20—25 : 1.

Wir untersuchten 10 solcher Fälle und konnten uns überzeugen, daß das Wachstum ziemlich schnell vor sich geht, und zwar ungestört von anderen Bakterien (sie sind wenig zahlreich). Das Ausbleiben des Wachstums nach 1—2 Monaten muß der Erschöpfung des Nährbodens zugeschrieben werden. Vom praktischen Standpunkte ist es von Wichtigkeit, daß das regste Wachstum auf die ersten Tage (1—9) fällt.

Nach dieser Prüfung gingen wir zur Untersuchung derjenigen Fälle über, bei welchen die üblichen Methoden keine Tuberkelbazillen nachweisen konnten:

Was die Bazillen anbetrifft, so zweifelten wir zunächst, ob sie wirkliche Tuberkelbazillen oder aber harmlose säurefeste Saprophyten

1) Auch ohne Glyzerin entwickeln sich die Tuberkelbazillen im Auswurfe bei 37° C, aber nach ungefähr 48 Std. gehen sie alle zugrunde.

2) Die Zuckerkonzentration darf nicht höher als 5proz. sein.

Auswurf der Tuberkulosekranken 2. Grades (nach Turban)[1].

Name	Zahl der Tuberkelbazillen nach 24 Std.	Zahl der Tuberkelbazillen nach 48 Std.	Nr.
A. Tsch.	4 im ganzen Präparat	23 im Präparat	1
A. K.	0	8 „ „	2
M. M.	0	5 „ „	3
We. O.	1 im Präparat	11 „ „	4
W. B.	0	11 „ „	5
N. B.	5 im Präparat	21 „ „	6
Th. K.	0	4 „ „	7
M. Sch.	0	7 „ „	8
S. L.	0	3 „ „	9

waren. Es gelang uns aber, die beiden Typen zu unterscheiden, ohne daß wir Tierversuche anstellten.

Die Unterschiede sind folgende: 1) Die säurefesten Bazillen kennzeichnen sich durch ihr schnelles Wachstum. In 1 von den oben erwähnten 27 Auswürfen konnten wir bei Anwendung unserer Methode 200 Stäbchen im ganzen Präparat (nach 48 Std.) nachweisen (mit der Homogenisierungsmethode kein einziges). 2) Die Lage der säurefesten Bazillen im Gewebe ist eine ganz andere, wie die der Tuberkelbazillen. Sie schmiegen sich nicht den Leukozyten an und liegen niemals mitten im Gewebe, sondern man trifft sie außerhalb der Zellelemente in Begleitung von Kokken, gramnegativen Stäbchen und anderen Bakterien.

Unter den 27 Auswürfen der Tuberkulosekranken 2. Grades fanden wir 3 (11 Proz.) mit säurefesten Saprophyten.

Auswurf der Tuberkulosekranken 1. Grades.

Es wurde der Auswurf von 38 Tuberkulosekranken 1. Grades untersucht. Mittels der Homogenisierungsmethode findet man die Tuberkelbazillen in solchen Auswürfen außerordentlich selten. Die Anwendung unserer Methode erlaubte, die Tuberkelbazillen in 3 Fällen (8 Proz.) zu ermitteln. Die säurefesten Saprophyten wurden 10mal (28 Proz.) gefunden.

Auswurf gesunder Personen.

Wir untersuchten 45 Personen, die subjektiv ganz gesund waren. In 10 von diesen Auswürfen (22 Proz.) wurden nach 24—48 Std. säurefeste Saprophyten nachgewiesen, und zwar in der üblichen Weise in Haufen von 20—30—60 in Begleitung von anderen Bakterien. In 2 Fällen konnten wir nach 8 Tagen eine massenhafte Entwicklung der säurefesten Stäbchen beobachten. Das Bild war von einem Klatschpräparat nicht zu unterscheiden.

An dieser Stelle möchte ich Frau Lourié-Sternherz, Assistentin am Reichslaboratorium, für die Hilfe, die sie bei der Ausführung dieser Arbeit geleistet hat, meinen verbindlichsten Dank aussprechen.

Zusammenfassung der Resultate.

Im Auswurfe der Tuberkulosekranken ist es möglich, solche Bedingungen zu schaffen, daß die Tuberkelbazillen, welche bei Anwendung

1) Es wurden 27 Auswürfe untersucht, davon konnten in 9 (33 Proz.) Tuberkelbazillen nachgewiesen werden.

der üblichen Untersuchungsmethoden nicht nachweisbar sind, die Möglichkeit bekommen, ungehindert zu wachsen, und zwar in solchem Tempo, daß sie nach 24—48 Std. ermittelt werden können.

Dank dieser Methode wurden im Auswurfe der Tuberkulosekranken (27 Fälle) 2. Grades (nach Turban) Tuberkelbazillen in 9 Fällen (33 Proz.) und säurefeste Saprophyten in 3 Fällen (11 Proz.) nachgewiesen.

In 38 Auswürfen der Kranken 1. Grades wurden Tuberkelbazillen 3mal (8 Proz.) und säurefeste Saprophyten 10mal (28 Proz.) gefunden.

Bei 45 gesunden Personen fanden wir die säurefesten Saprophyten 10mal (22 Proz.).

Was uns von besonderem Interesse scheint, ist das häufige Auftreten der säurefesten Stäbchen im Auswurfe Gesunder und im Anfangsstadium der Krankheit (22—28 Proz.). Angesichts der Tatsache, daß es einigen Autoren gelungen ist, Saprophyten in Parasiten zu verwandeln, gewinnen diese Resultate eine gewisse Bedeutung vom Standpunkte der Aetiologie der Tuberkulose.

Ueber ein übertragbares, alkalibildendes Agens gewisser Coli-Stämme.

[Aus dem Institut für allgemeine und experimentelle Pathologie der Universität Wien.]

Von Dr. **Hermann Chiari** und Dr. **Ernst Löffler.**

Mit 1 Tafel.

Vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Beschreibung und Erklärung einer Erscheinung, die wohl den meisten Bakteriologen, die sich in größerem Maße mit Stuhluntersuchungen befaßt haben, bekannt sein dürfte, die wir aber bis jetzt in der Literatur nirgends erwähnt fanden.

Nicht zu selten begegnet man unter einer Serie von Stuhlplatten einzelnen, welche nach der üblichen Bebrütungsdauer weiße, bzw. blaue Flecke — je nach Verwendung von Endo- oder Drigalski-Agar — von meist rundlicher bis ovaler Form aufweisen. Da wir uns bei unseren Untersuchungen in erster Linie des Endo-Nährbodens bedient haben, wollen wir im folgenden diese jetzt näher zu beschreibenden Partien vorläufig kurz als weiße Flecke bezeichnen (w. F.).

Das Auftreten dieser w. F. erfolgt unregelmäßig, gewissermaßen schubweise, indem sie sich an manchen Tagen unter dem Untersuchungsmaterial sehr häufig finden. Dann bleiben sie wieder für einige Zeit aus, um nach kürzerem oder längerem Intervall bald spärlicher, bald

häufiger wieder aufzutreten. Bemerken müssen wir, daß unser Untersuchungsmaterial hauptsächlich aus einem Spital stammte. Das schubweise Auftreten der w. F. erinnert an das Auftreten des B. proteus, den man ebenfalls bisweilen beinahe auf allen Platten findet, während er zeitweise wieder vollständig ausbleiben kann. Sicherlich sind schon manchmal unsere w. F. mit den durch B. proteus erzeugten farblosen bzw. blauen Stellen der Stuhlplatte verwechselt worden.

Im allgemeinen können wir sagen, daß unsere w. F. an den Stellen aufzutreten pflegen, wo das Stuhlmaterial auf die Platte aufgebracht wurde und demnach die sich entwickelnden Kolonien am dichtesten stehen. Dort sieht man nun nach der Bebrütung einen bald größeren, bald kleineren rundlich oder oval begrenzten w. F. Die Ränder sind zumeist sehr scharf, so daß der Unterschied zwischen den geröteten und den farblosen (bzw. blauen bei Drigalski) Partien ein ungemein deutlicher ist, so deutlich ungefähr, wie zwischen den typischen, metallisch glänzenden Coli- und den Kolonien des B. faecalis alcaligenes. Der Rand des w. F. zieht bei sehr dicht bewachsenen Platten ganz scharf mitten durch die Kolonien, die, bis auf die Farblosigkeit, völlig das Aussehen der roten Coli-Kolonien zeigen.

Beobachtet man so eine Platte durch längere Zeit, so sieht man, wie sich dieser w. F. vergrößert. An dicht bewachsenen Partien der Platte schreitet die Ausbreitung konzentrisch und gleichmäßig fort. An jenen Stellen jedoch, wo sich entsprechend der von uns geübten Platinspachtel-Ausstrich-Methode (Ghon) schon isolierte, in Strichen angeordnete Koloniengruppen finden, geht die Ausbreitung vorwiegend diesen nach. Die zuerst regelmäßige Begrenzung der w. F. wird dadurch entsprechend der Anordnung der Kolonien unregelmäßig, indem es da zu Ausbuchtungen der Begrenzungslinie kommt. Nach einigen Tagen kann durch das allmähliche Fortschreiten der w. F. die ganze Platte farblos werden, da kleine kolonienfreie Zwischenräume von den Kolonien der Nachbarschaft aus allmählich auch aufgehellt werden. Zu einem geeigneten Zeitpunkt kann man manchmal wahrnehmen, wie eine größere Coli-Kolonie zur Hälfte rot, zur Hälfte bereits farblos ist.

Die Ausbreitung der w. F. erfolgt also längs der Kolonien, wobei die neu entfärbten Anteile genau so aussehen, wie die ursprünglichen w. F. Auch unbewachsene Teile der Platte werden dabei in die Aufhellungszone mit einbegriffen.

Stößt nun die Ausbreitung auf einen zufälligen Riß in der Platte oder ist ein solcher absichtlich gesetzt worden, so macht sie daselbst halt, woraus zu schließen ist, daß zur Ausbreitung der w. F. die Kontinuität des Nährbodens gewahrt sein muß.

Exzidiert man den ursprünglichen w. F. zur Gänze, so bleibt die Platte unverändert rot. Exzidiert man jedoch so, daß von dem ursprünglichen w. F. noch ein schmaler Rand übrig bleibt, so schreitet von diesem aus die Aufhellung genau so fort, wie wenn der ganze ursprüngliche w. F. noch vorhanden wäre. Ganz ebenso wie der ursprüngliche w. F. verhalten sich die nachträglich weiß gewordenen Partien; auch von diesen geht die Aufhellung weiter, wenn sie exzidiert werden, sofern nur ein schmaler aufgehellter Rand erhalten geblieben ist. Man kann also den ganzen ursprünglichen und den größten Teil der durch ihn zuerst aufgehellten Anteile exzidieren, ohne daß das Vorwärtsschreiten der w. F. unterbrochen wird.

Ueberträgt man nun ein Stück eines derartigen w. F. oder ein Stück

aus seinem Ausbreitungsgebiet auf eine mit gewöhnlichen Coli bewachsene rote Endo-Platte, so wird diese in gleicher Weise verändert. Im Umkreise des aufgelegten Stückes beginnt eine Aufhellung, die sich in der oben geschilderten Weise ausbreitet, bis nach einiger Zeit die ganze Platte entfärbt ist. Dabei ist es gleichgültig, ob das Stückchen mit den Kolonien nach oben oder unten aufgelegt wurde. Die so entstandene sekundäre Aufhellungszone verhält sich in allen Stücken wie der primäre w. F.: Sie breitet sich in ganz analoger Weise aus, läßt sich immer wieder von Platte zu Platte übertragen (Passagen), ohne daß eine sichtbare Abschwächung eintritt. Auf diese Art haben wir viele Passagen verfolgt. Diese Art der Uebertragung geht bei Brut- und Zimmertemperatur vor sich. Ist das exzidierte Stück sehr dünn und klein, die Platte, auf die es übertragen wird, jedoch dick und dicht bewachsen, so kann die Aufhellung ausbleiben, wobei das aufgelegte Stück gerötet wird.

Eine verläßlichere und rascher zum Ziele führende Methode besteht darin, daß man das exzidierte Stückchen auf eine mit Coli-Reinkultur frisch beimpfte Platte legt und nun bebrüten läßt. Am nächsten Tag hat man dann um das aufgelegte Stück herum den beschriebenen w. F. auf der sonst roten Endo-Platte. Auf diese Art haben wir bis zu 40 Passagen angelegt. Mit Hilfe der Passagen kann man sicher sein, w. F. auf Coli-Reinkulturplatten zu erzielen und weiter übertragen zu können.

Die Erzeugung eines derartigen sekundären w. F. gelingt aber nur, wenn sich auf dem Uebertragungsstück der Aufhellungszone Coli-Kolonien befinden. Fehlen solche, so wird das übertragene Stück selbst rot. Bringt man w. F. auf gerötete kolonienfreie Stellen einer Coli-Endo-Platte, so entsteht zumeist keine Aufhellungszone, allenfalls ein kleiner heller Hof, der sich nicht weiter ausbreitet, wenn sich in der Nähe keine Kolonien finden.

Ueberimpft man einzelne weiße Kolonien aus dem Bereiche des ursprünglichen w. F., der Aufhellungszone oder des sekundären w. F., so erhält man gewöhnlich rote Coli-Kolonien. Nimmt man jedoch reichlich Impfmaterial von dem ursprünglichen w. F., so entstehen auch auf der neuen Platte w. F. Impft man gewöhnliche Coli-Kolonien auf w. F., von denen man den Kulturrasen durch Abkratzen größtenteils entfernt hat, oder auch zwischen die Kolonien eines w. F., so wachsen diese farblos. Streicht man ein Gemisch von rotwachsendem Coli und Coli, der von einem w. F. stammt, dicht aus, so entstehen auf der neuen Platte zahlreiche w. F.

Diese Eigenschaften der w. F., die Uebertragbarkeit und die Möglichkeit, sie durch beliebig viele Passagen fortzuführen, legte die Vermutung nahe, daß es sich hier um ein dem d'Herelleschen ähnliches Agens handle. Insbesondere schien der Umstand, daß die Ausbreitung der w. F. an die lebende Bakterienkultur gebunden ist, und von hier aus immer wieder regeneriert wird, in diesem Sinne zu sprechen.

Um hier bestehende etwaige Beziehungen zu klären, untersuchten wir eine Reihe von lysiblen Coli-Stämmen mit den dazu gehörigen Bakteriophagen. Es zeigte sich indessen, daß zwischen dem Auftreten von taches vierges und w. F. keinerlei Beziehungen bestehen. Unter den untersuchten Stämmen, die wir der Liebenswürdigkeit von Herrn Dr. Zdansky verdanken, fand sich jedoch einer, welcher beim Auf-

streichen auf Endo stets w. F. lieferte, die sich bezüglich Ausbreitung und Uebertragbarkeit genau so verhielten, wie die in den verschiedenen Stühlen aufgefundenen. Wir hatten also in diesem Stamme ein Reinkultur, welche regelmäßig w. F. bildete (Coli-W-Stamm, CW). So wie Gildemeister und Herzberg[1]) sich bei ihren Untersuchungen über das d'Herellesche Phänomen ihres Coli 88 erfolgreich bedient haben, haben wir es für einfacher gehalten, mit Hilfe dieses CW der Erklärung des Phänomens der w. F. näher zu treten, statt von den w. F. der Stuhlplatten auszugehen. Auch lag es nunmehr nahe, in den w. F. der Stuhlplatten ähnliche Stämme wie den CW zu vermuten. Und in der Tat gelang es, aus einem w. F. einen solchen Stamm herauszuzüchten.

Wir gingen dabei so vor, daß wir von einem w. F. einer Stuhlplatte reichlich Material ausstrichen und dieses Verfahren wiederholten. Nach mehrmaligen Passagen gelang es, von einzelnen Kolonien abzuimpfen und so eine Reinkultur zu bekommen, die sich in allen Stücken wie der CW verhielt.

Auftreten und Ausbreiten der w. F. beim CW ist völlig analog den eingangs erwähnten w. F. Auch hier treten die w. F. an der Stelle des dichtesten Wachstums auf. Während aber w. F. von einer Stuhlplatte in der Regel nur durch reichliches Abimpfen aus dem weißen Gebiet weiter übertragen werden können, gelingt die Erzeugung von w. F. mit den CW-Stämmen schon durch Abimpfen einer einzelnen Kolonie, gleichgültig ob diese von einem w. F. oder dem rot gebliebenen Areale stammt. Wir müssen daher annehmen, daß der CW auch in seinen noch rot gebliebenen Kolonien die Fähigkeit, w. F. zu bilden, latent inne hat. Die Erklärung für dieses anscheinend differente Verhalten liegt darin, daß, während jede Kolonie der CW-Stämme neu verstrichen, wieder Platten mit w. F. liefert, man bei den w. F. der Stuhlplatten wohl zumeist einen sekundär weiß gewordenen gemeinen Coli überträgt, der dann, wie oben erwähnt, weiter rot wächst. Würde man zufällig gleich beim ersten Abimpfen auf eine Kolonie eines CW stoßen, so könnte man sofort das Auftreten von w. F. erwarten.

Der aus einem w. F. einer Stuhlplatte herausgezüchtete CW-Stamm war von dem Bakteriophagen des zuerst gefundenen CW-Stammes gleichfalls lysibel und verhielt sich auch in seinem sonstigen kulturellen Verhalten jenem völlig analog. Die durch CW-Stämme sekundär weiß gewordenen gemeinen Coli-Reinkulturen zeigten dies Verhalten nicht: sie waren gegenüber den Bakteriophagen der CW-Stämme lysoresistent. Selbstverständlich breiteten sich die durch CW erzeugten sekundären w. F. ebenso aus, wie die primären w. F. und ließen sich in gleicher Weise durch zahllose Passagen fortführen. Dagegen wachsen auch hier isoliert abgeimpfte Kolonien der sekundären w. F. auf frischen Platten rot.

Das Phänomen der w. F. der CW-Reinkulturen läßt sich auch im flüssigen Medium beobachten. Beimpft man eine Bouillon, der eine geringe Menge verflüssigten Endoagars zugesetzt ist, mit einem CW, so beobachtet man schon nach 24 Std., wie die anfänglich rote Bouillon in den obersten Schichten abzublassen beginnt. Nach wenigen Tagen ist die ganze Bouillon weiß geworden, während Kontrollröhrchen mit gemeinem Coli noch rot sind.

1) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 93. 1924. S. 6.

Das kulturelle Verhalten der CW-Stämme in der bunten Reihe ist vollkommen mit dem Wachstum der typischen Coli-Stämme identisch. Hervorzuheben ist, daß sowohl die Barsiekow-Nährböden wie auch die Lackmusmolke gefällt bzw. stark gerötet werden, und daß auch bei mehrtägiger Bebrütung der Farbenton nicht umschlägt. Nur in einer Hinsicht zeigten die CW-Stämme ein abweichendes Verhalten. Sie wiesen nämlich außer der diffusen Trübung der Bouillon eine deutliche Häutchenbildung auf.

Bisher hatten wir uns bei unseren Untersuchungen auf B. coli und Endo- bzw. Drigalski-Agar beschränkt. Es lag nun nahe, das Verhalten der w. F. auf anderen Nährböden und gegenüber anderen Bakterien zu prüfen, um festzustellen, ob das Vorhandensein von Milchzucker eine Vorbedingung für das Zustandekommen der w. F. sei und ob diese auf B. coli beschränkt seien. Zu diesem Behufe beimpften wir den üblichen Mannitnährboden mit unserem CW. Es ergab sich die Tatsache, daß auch hier in gleicher Weise blaue Flecke entstanden, die sich auch weiter ausbreiteten und in Passagen fortzüchten ließen. Weiter prüften wir die Uebertragbarkeit der w. F. auf Reinkulturen von B. typhi, paratyphi A und B und dysenteriae Flexner mit Hilfe von Mannitplatten. Dabei zeigte sich, daß das Ausbreiten der blauen Flecke auf der Flexner- und Paratyphus B-Platte ebenso gut vor sich ging wie auf der Coli-Platte, während der Beginn der Ausbreitung bei Typhus und Paratyphus A stark verzögert war und dann nur langsam in der nächsten Umgebung des CW erfolgte. Auch die Rückübertragung der durch CW auf Mannit blau gewordenen Flexner- und Paratyphus B-Flecke auf Coli-Platten bzw. weitere Passagen auf Flexner und Paratyphus B gelangen ausnahmslos.

Aus dem Verhalten der w. F., nämlich ihrer fortgesetzten Uebertragbarkeit in Passagen, ihrer Gebundenheit an wachsende Bakterien, mußten wir annehmen, daß unser Agens mit dem des d'Herelleschen Phänomens in eine Gruppe gehört. Genau wie dort mußte hier die Frage nach der Natur des Agens aufgeworfen werden. In Würdigung der Ausführung Gildemeisters und Herzbergs über das d'Herellesche Phänomen an der Hand ihres Coli 88 müssen wir sagen, daß die Fermentnatur des die w. F. erzeugenden Agens sehr wahrscheinlich ist. Wir haben versucht, den CW dauernd von dem die w. F. erzeugenden Agens zu befreien. Längeres Kultivieren in Galle, Uebertragen in hochkonzentrierte Kochsalzlösung, Belichtung, Pasteurisieren bei 55°, Züchtung bei niederen Temperaturen, abgestuftes Behandeln mit Glyzerin, destilliertes Wasser, Züchtung in stark sauerer Bouillon (gepuffert, pH 5) lieferten ein negatives Ergebnis. Solange überhaupt ein Bakterienwachstum erfolgte, stellten sich auch auf unserer Endo-Platte die w. F. ein. Es gelang uns niemals, die Bildung der w. F. dauernd zu verhindern, auch wenn wir durch ungünstige Nährböden selbst durch mehrere Passagen die Bildung der w. F. zeitweise unterdrücken konnten. Wir machten z. B. die Erfahrung, daß die für das Zustandekommen der w. F. auf Endo-Platten optimale Reaktion etwa bei pH 7,6 liegt. Impft man jedoch von einer ungünstigen Endo-Platte, auf der der CW rot gewachsen ist und keine w. F. gebildet hat, auf Endo von pH 7,6, so treten wieder w. F. auf. Abnorm dick gegossene Platten ließen gleichfalls w. F. vermissen, ebenso fehlten sie regelmäßig auf anaërob bebrüteten Platten, um später unter normalen Um-

ständen wieder zu erscheinen: Das alles sind Momente, welche für die Fermentnatur unseres Agens sprechen.

Nur durch eine einzige Maßregel gelang es uns, die Bildung der w. F. der CW-Stämme dauernd zu unterdrücken. Züchteten wir aus unseren CW-Stämmen durch Behandlung mit dem Bakteriophagen den resistenten Stamm, so bildete dieser niemals w. F.; durch diese Maßnahme waren also unsere CW-Stämme von dem wirksamen Agens dauernd befreit worden. Trotz dieses Umstandes halten wir an den Fermentnatur dieses Agens fest, da der resistente Stamm auch in der bunten Reihe sich in seinen fermentativen Fähigkeiten wesentlich geändert hat. So rötet er Dextrose-Barsiekow und Milchzucker-B. nur schwach, greift Maltose und Mannit anfangs gar nicht und später schwach an. Traubenzuckeragar wird in gewöhnlicher Art vergoren. Auch die bei CW so konstante Häutchenbildung fehlt bei den resistenten Stämmen regelmäßig. Die Einbuße der Fähigkeit der resistenten Stämme, w. F. zu bilden, spricht also nicht gegen die Fermentnatur unseres Agens, zumal da auch andere fermentative Eigenschaften verändert zu sein scheinen.

In bezug auf die Uebertragbarkeit weiß gewordener Partien verhält sich der resistente CW wie ein gemeiner Coli. Macht man nämlich nach der oben beschriebenen Methode den Uebertragungsversuch, so gelingt es wohl, sekundäre w. F. zu erzielen, es gelingt jedoch nicht, durch Abimpfen von solchen weiß gewordenen Kolonien des resistenten CW-Stammes w. F. zu erzeugen. Wir haben auch versucht, das Ferment durch immerwährendes Uebertragen auf ein und denselben typischen Coli-Stamm diesem gleichsam anzuzüchten, ein Versuch, der zu keinem Ergebnis geführt hat. Dabei gingen wir so vor, daß wir Kolonien von einem sekundären w. F. einer Coli-Reinkultur immer wieder auf frische Nährböden ausstrichen und daselbst der Wirkung eines w. F. aussetzten; die jedesmal entstandenen w. F. wurden in gleicher Weise weiter behandelt.

Es erübrigte sich noch festzustellen, auf welche Weise das Phänomen der w. F. bedingt würde. Der Farbenumschlag von rot in farblos bzw. von rot und blau wies von vornherein auf eine Alkalibildung hin. In darauf hingerichteten Versuchen zeigte es sich, daß dies auch tatsächlich der Fall ist. Wir beimpften Bouillonkölbchen von einer bekannten pH mit dem CW-Stamm, dem resistenten CW-Stamm und einem gemeinen Coli. Bei fortlaufenden täglichen Bestimmungen zeigte es sich, daß der CW-Stamm wesentlich mehr Alkali bildete als die beiden anderen. Die größten Ausschläge erzielten wir, wenn wir von einer stark sauren Bouillon (pH 5,6) ausgingen. Der formoltitrierbare Stickstoff war im Gegensatz zu der Alkaliproduktion wesentlich geringer als bei den zwei anderen Stämmen. Der resisente CW-Stamm und der gemeine Coli-Stamm verhielten sich annähernd gleich.

Wir kommen also zu dem Schluß, daß unsere CW-Stämme ein Alkali bildendes, aërophiles Ferment enthalten, das andere Bakterien zwingt, ebenfalls Alkali zu produzieren. Mit diesem Ferment infizierte Bakterien können wieder andere Stämme zur Alkalibildung anregen, ohne daß eine Abschwächung erfolgt, woraus wir auf eine ständige Regeneration des Fermentes schließen müssen. Daß die Bildung der w. F. immer ihren Ausgang von der am dichtest bewachsenen Stelle nimmt, dürfte darin seinen Grund haben, daß es zu ihrem Zustandekommen einer gewissen Konzentration des Fermentes bedarf.

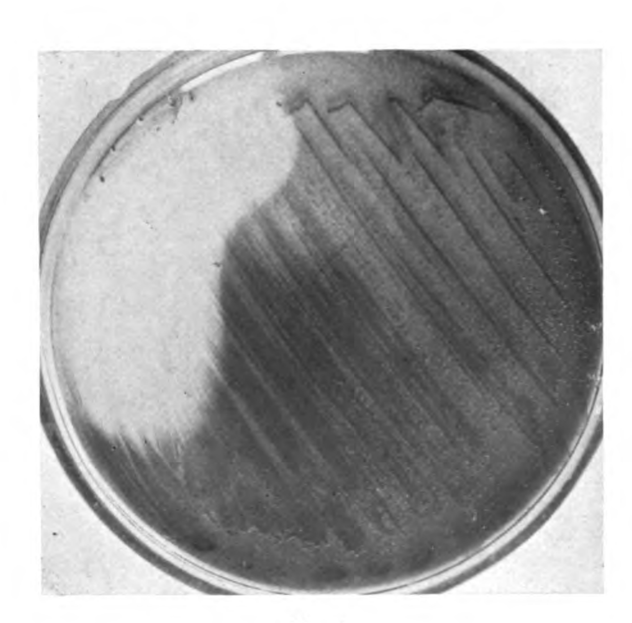


Fig 1.

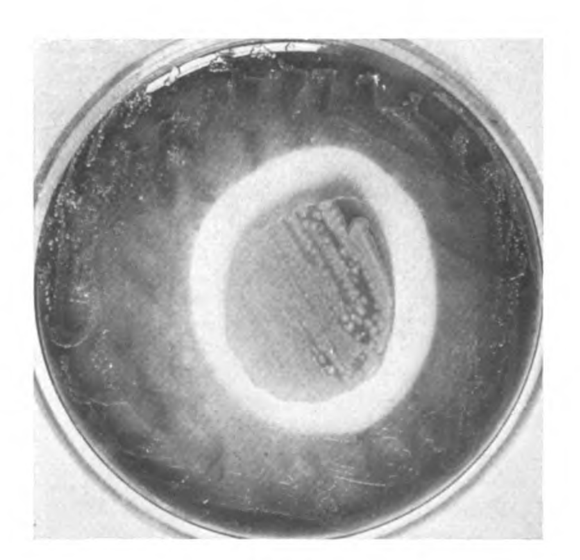


Fig. 2.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

Zusammenfassung.

In vorliegender Arbeit wird das Auftreten von farblosen bzw. blauen Flecken auf Endo- und Drigalski-Agar beschrieben und näher untersucht.

Als Ursache für dieses Phänomen wird eine besondere Art von Bacterium coli angegeben, das ein aërophiles alkalibildendes Ferment besitzt, das von Kultur zu Kultur in beliebig häufigen Passagen auch auf fremde Bakterien übertragbar ist, die es wiederum zur Alkalibildung anregt.

Wir schlagen für diese Art von Coli-Stämmen den Namen B. coli alcaligenes vor.

Erklärung der Tafelabbildungen.

Fig. 1. Weißer Fleck auf einer Endo-Platte einer Reinkultur eines CW-Stammes.

Fig. 2. Sekundärer weißer Fleck s. S. 97.

Ueber einige ältere deutsche Malariaepidemiekurven.

[Aus dem Institut für Schiffs- und Tropenkrankheiten, Hamburg.]

Von **E. Martini.**

Mit 1 Kurve im Text.

Seit ich mich mit Malaria beschäftige, haben mich die Kurven besonders interessiert, welche Ziemann zusammengestellt in seinem Malariaband des Menseschen Handbuches bringt. Wer als Naturwissenschaftler das Bedürfnis fühlt, über die Erscheinung zu den Grundlagen, den Gesetzen, vorzudringen, dem wird die große Verschiedenheit des Malariaverlaufes, wie er sich in jenen Kurven spiegelt, störend erscheinen. Als mich dann mein Dienst an der Balkanfront überzeugt zeugt hatte, daß neben der Auswirkung der Mückenverhältnisse, Besonderheiten des Plasmodienlebens im Menschen, Blütezeiten, in noch höherem Maße die Epidemiekurve der einzelnen Malariaarten formen, habe ich nach Erklärungen gesucht, welche es ermöglichen, jene Kurven als den Ausdruck doch nur eines und desselben Gesetzes anzusehen. Ich habe zunächst geglaubt, in klimatischen Verhältnissen, in solchen der Besonnung in erster Linie, welche ja im Nordseeklima auch deutlich 2 Gipfel hat, die Ursache für die Verschiedenheiten der Malaria an verschiedenen Plätzen auffinden zu müssen. Ich glaube auch noch, daß solche Einflüsse wirken. Doch will es mir jetzt wahrscheinlicher dünken, daß zufällige Verschiedenheiten in den Lebensverhältnissen des untersuchten Menschenmaterials in erster Linie die Verschiedenheiten der Kurven bedingen, in dem Sinne, daß eine als die normale, die andere als durch besondere, wohl durchsichtige Verhältnisse modifizierte anzusehen sind, daß daher alle in ganz gleicher Weise vollständig zu dem Malariagrundgesetz stimmen.

Dieses Grundgesetz sehe ich besonders schön ausgeprägt in einer Tabelle von Weydemann, Die Malaria im nördlichen Jeverlande 1906.

Tabelle I.
Die Malaria 1906.

	Jan.	Febr.	März	April	Mai	Juni	Juli	August	Sept.	Okt.	Nov.	Dez.
1901	—	—	—	1	3	6	3	9	9	3	—	—
1902	—	1	3	14	12	17	11	5	3	2	—	—
1903	1	—	2	4	5	6	5	1	—	2	—	—
1904	—	—	—	1	6	7	2	—	3	—	—	—
1905	—	—	—	1	—	2	7	5	—	—	—	—
1906	—	—	2	11	12	—	—	—	—	—	—	—
Summa	1	1	7	32	38	38	28	20	15	8	—	—

Nach meiner Auffassung läuft nämlich das Malariajahr ungefähr von Juli zu Juli. Es bringt bei der Tertiana in seiner 1. Hälfte Ende Juli, August, September die Neuinfektionen und an sie anschließende frische Erkrankungen mit wenig Rückfällen, dann die winterliche Ruhezeit und im Frühjahr die Zeit der Rückfälle und der Ersterkrankungen bei überliegenden Fällen, d. h. solchen, welche eine über den ganzen Winter verlängerte Inkubation haben. In den Winter- und Frühjahrsmonaten dürften die Ersterkrankungen auf Grund frischer Infektion außerordentlich selten sein, und keinen nennenswerten Anteil an der Kurve nehmen. Erst im Juni und Anfang Juli können wir mit den ersten Fällen dieser Art rechnen. Vgl. hier als Begründung die Beobachtungen an den deutschen und Balkantruppen (Martini, Berechnungen und Beobachtungen zur Epidemiologie und Bekämpfung der Malaria. Hamburg (Gente) 1921, S. 10, 11), die das Gewicht eines Massenexperiments haben. Da ich der Meinung bin, wofür ja die Kriegsliteratur zahlreiche Beispiele bringt, daß ein sehr großer Teil der Infektionen jeder Sommer-Herbstperiode überliegt, also die ersten deutlichen Erscheinungen erst im Frühjahr macht und die so entstehende Gruppe von Ersterkrankungen im Frühjahr verstärkt wird durch die Rezidive, muß, denke ich, der Frühjahrsgipfel im Endemiegebiet höher als der des Sommers sein. In der obigen Kurve sehen wir 1901 im August und September eine deutliche Steigerung der Fälle nicht nur gegenüber den Vormonaten, sondern, wie Verf. angibt, auch den Vorjahren. An diese Neuinfektionsepidemie des Herbstes schließt sich die hohe Rückfall- und Ersterkrankungsepidemie des Frühjahrs 1902. Die Malaria der Infektionszeit 1902 ist mäßig und entsprechend ist es auch 1903 die Frühjahrsepidemie. Nun folgen 1903 und 1904 zwei malariarme Infektionszeiten, und entsprechend sind die Frühjahre 1904 und 1905 malariaarm, und die Erhöhung der Infektionen im Hochsommer 1905 zieht sofort wieder eine stärkere Erhöhung der Frühjahrsepidemie 1906 nach sich. Summiert man diese durch je zwei halbe Kalenderjahre laufenden Malariajahre, so ergibt sich die Summenreihe aus den Jahren 1901—1906 mit Gipfel im Mai/Juni.

Diese Form des durchschnittlichen Malariaganges im Kalenderjahr ist aber keineswegs die des Malariaganges eines jeden einzelnen Kalenderjahres, wie aus dem Vorhergehenden sich ergibt. Im Infektionsjahr wird der Gipfel eben im Hochsommer liegen (s. Kurve 1 S. 107). Und je nachdem, welchen Anteil an der gesamten Malaria

eines Jahres die alten Infektionen und die des Jahres selbst haben, wird sich der Jahresgipfel mehr gegen das Frühjahr oder gegen den Herbst verschieben. Aus einer einzelnen Jahreskurve kann man also das Malariagesetz nicht ablesen, weil sie sich aus Hälften verschiedener Malariajahre zusammensetzt. Ebenso ist es natürlich denkbar, daß klimatische Verhältnisse im einzelnen Jahre dazu führen, sowohl die Rückfallzeit als auch die Neuinfektionszeit zu verfrühen oder zu verspäten, ganz abgesehen davon, daß soziale und wirtschaftliche Eigenheiten bestimmter Jahre auch einmal abweichende Jahreskurven bringen könnten. Daher ist es kein Wunder, daß die einjährige Beobachtung von Mühlens uns hier nicht weiter interessiert.

	Mai	Juni	Juli	August	Sept.	Okt.
Malariaerkrankungen unter der Zivilbevölkerung in Wilhelmshaven, Heppens, Band Neuende 1907	2	51	62	25	12	5

Die von Claus in seinem Artikel über die Malaria in Thorn gegebenen, übrigens recht kleinen Zahlen lassen sich hier nicht verwerten, weil der Autor nicht die wirklichen Erkrankungsdaten tabellarisiert hat, sondern die durch Abzug von 12 Tagen errechneten vermutlichen Infektionen. Eine Uebersicht der Erkrankungen nach den Monaten läßt sich daher leider nicht rekonstruieren.

Tabelle II.

	Jan.	Febr.	März	April	Mai	Juni	Juli	August	Sept.	Okt.	Nov.	Dez.
I.	5,35	5,69	5,79	6,52	6,65	5,94	5,81	17,84	**20,94**	18,96	12,96	7,01
II.	198	212	490	748	790	490	326	1182	**1318**	596	334	212
III.	68	118	341	794	**1292**	1147	679	446	272	92	60	42
III a.	22	21	19	37	**74**	71	39	24	15	17	8	11
III b.	62	63	85	155	160	**173**	119	117	101	76	68	55
[III d.	4	12	45	79	**141**	79	37	30	23	1	6	2]
IV.	69	84	113	114	243	**282**	240	190	109	46	41	43
V.	147	140	149	395	689	**854**	844	503	237	148	143	110
V a.	205	151	170	359	631	**656**	562	396	201	159	147	124
V b.	0,3	0,2	0,3	0,75	1,3	**1,5**	1,4	0,9	0,45	0,4	0,3	0,2
VI.	33	30	34	53	94	**140**	131	114	87	53	38	28
VII.	18	16	24	26	**34**	31	28	27	20	17	16	14
VIII.	257	231	**422**	779	**1110**	855	658	698	846	702	512	312

I Krankenzugang an Marschfiebern in Wilhelmshaven 1860—1869 unter den Arbeitern während des Hafenbaues. Durchschnittszahlen aus den 10 Jahren berechnet auf Grund von Wenzels monatlichen Angaben in Prozenten der Iststärke. II Malaria in Dithmarschen 1842—63, Dose. III Leipzig, Thomas 1832—65, IIIa Kiel, Beckmann 1864—89, IIIb Erlangen, Mayr 1858—87, IIId Jacobsspital nach Thomas, Leipzig, Beginn der Erkrankungen, IV Bayerische Armee 1874/75—96 Mayer, V I. A.-K., Grawitz, Va V. Korps nach Grawitz 1884—88. Vb Deutsche Armee in demselben Jahre einschließlich württemb. und sächs. Korps in $^0/_{00}$, VI Oesterr.-ungar.-galizisches Korps nach Mayer 1895—1899, VII Niederländ. Armee nach Mayer 1895—99, VIII Wiener Klinik, Hussa 1849—58.

Zu den Kurven bei Ziemann und einigen entsprechenden Zahlenreihen anderer Autoren bin ich jetzt zu folgender Stellungnahme gekommen: Nr. 3 Leipzig: Es ist nicht wahrscheinlich, daß jemand wegen seiner Malaria Leipzig dauernd verlassen hat, und es ist auch nicht wahrscheinlich, daß trotz der Fluktuation der Bevölkerung in den größeren Städten in der Zeit von 1832—65 die Abwanderung von Leipzig so groß gewesen ist, daß sie epidemiologisch ins Gewicht fällt,

oder daß Zu- und Abwanderung an bestimmte Monate gebunden waren, wovon Aenderungen der Kurve eingetreten sein könnten. Danach scheint Leipzig eine typische Epidemiekurve zu haben, gekennzeichnet als solche durch den alleinigen Frühjahrsgipfel. Ziemlich genau ebenso verhalten sich die auf Krankenhausstatistik aufgebauten Zahlenreihen IIIa Kiel nach Bechmann und IIIb Erlangen nach Mayr. Ganz ähnlich ist auch Zahlenreihe IV. Und das ist selbstverständlich, wenn sowohl Rekruten aus Malariagegenden durch ihre Einziehung entfernt werden, als Rekruten aus gesunden Gegenden in Malariagarnisonen kommen und sich beide Vorgänge die Wage halten. Dann kann der Charakter der normalen Endemiekurve nicht geändert sein.

Würde dagegen das Land meist malariafrei sein, einige Garnisonen dagegen verseucht, so würde sich z. B. folgendes abspielen:

	1884		1885				1886				1887				1888				
	F.	S.	H.	W.	F.	S.	H.	W.	F.	S.	H.	W.	F.	S.	H.	W.	F.	S.	H.
Jahrg.	81	81																	
	82	**82**	82	82	**82**	**82**													
	83	**83**	83	83	**83**	**84**	83	83	**83**	**83**									
			84	84	84	**84**	84	84	**84**	**84**	84	84	**84**	**84**					
							85	85	85	**85**	85	85	**85**	**85**	85	85	**85**	**85**	
											86	**86**	86	**86**	86	86	**86**	**86**	86
															87	87	87	**87**	87
																			88

Da im Oktober — die Rekruten kommen ja meist erst Mitte Oktober — die Infektionszeit in Deutschland wahrscheinlich vorüber ist, die Frühjahrsmalaria aber fast ausschließlich Rückfallmalaria ist, so waren Jahrgang 82 im Herbst 82 nicht exponiert, ebensowenig im Frühjahr 83, zuerst also im Sommer 83, dann im Frühjahr 84 den Rezidiven aus dem Sommer vorher, im Sommer 84 Neuinfektionen, im Frühjahr 85 wieder Rezidiven und im Sommer 85 nochmals Neuinfektionen. Also kann der Jahrgang sich zweimal an den Frühjahrsepidemien und dreimal an den Sommerepidemien beteiligen. Das heißt, an der Frühjahrsrückfallepidemie jeden Jahres sind nur 2 Jahrgänge, an der Sommer- oder Neuansteckungsepidemie 3 Jahrgänge beteiligt. Beide Teile der Epidemie gehen aber in der Epidemiekurve kontinuierlich ineinander über. Durch dies Verhalten kann also nur der absteigende Schenkel der Kurve erhöht werden, und damit rückt der Gipfel auch weiter nach rechts. Es kann also wohl durch die besonderen Verhältnisse des Militärs, wenn es in einzelnen Garnisonen einer erhöhten Malariagefahr ausgesetzt ist, der Unterschied von Kurve 5 (Malaria beim I. A.-K. Ostpreußen) gegen 3 und 4 gut erklärt werden. Es muß jedoch auch bemerkt werden, daß eine Kurve, die nur 5 Jahre umfaßt, keinen Anspruch hat, für die betreffende Gegend als typisch zu gelten, und es wäre sehr wohl möglich, daß dieselbe Kurve für das I. Armeekorps und die Jahre 1874—96 konstruiert viel genauer mit den Endemiekurven übereinstimmen würde, daß ihre Besonderheiten also sogenannte zufällige sind.

Die Originalarbeit von Grawitz gibt ferner eine Kurve des V. A.-K. und eine Kurve für die ganze Armee einschließlich sächsischen und württembergischen Kontingentes.

Erstere (Va) hat Mai/Juni Gipfel, letztere (Vb) den Gipfel im Juni. Dann folgt der Juli und nicht viel weniger hoch der Mai, so daß diese Kurve zwischen den beiden des I. und V. Korps liegt. Es spricht das dafür, daß neben den allgemeinen Gründen, die in der

Jahreszeit der Rekruteneinziehung beruhen, auch lokale Verhältnisse den Einfluß dieses Faktors in verschiedenen Gebieten sich verschieden deutlich auswirken lassen.

Das Material von Dose enthält 29 Proz. Quartana, davon über die Hälfte in den Herbstmonaten. Von der Kurve ist also nicht sicher zu sagen, wie weit ihre Form durch Mitbeteiligung der Quartana bestimmt wird. Auch über die Lebensverhältnisse der Bevölkerung hören wir nichts. Doch habe ich von älteren Leuten aus den holsteinischen Marschen erfahren, daß in ihrer Kinderzeit, als noch jeder Junge sein Wechselfieber durchmachen mußte, auch besonders die von der Geest zur Erntearbeit kommenden Leute unter den Fiebern gelitten haben. Nr. 2 bezieht sich also auf eine Gegend mit zwei verschiedenen Bevölkerungsanteilen, den seßhaften Bewohnern der Marsch und den Saisonarbeitern von der Geest. Ersteren eignet als typische Tertianaendemiekurve mit Gipfel im Mai der linke Teil der Kurve, an dem rechten ist sie weniger beteiligt. Dieser kommt wahrscheinlich von den Erntearbeitern, die im August oder Ende Juli von der Geest kommen und daher an der Frühjahrskurve nicht beteiligt sein können, und den Quartanfällen. Die Arbeiter kommen als nicht immun in geringe Unterkunftsverhältnisse in ein schwer malariaverseuchtes Land und erleben daher jedes Jahr eine schwere Epidemie, ihre Rückfälle im Frühjahr dürften meist nicht mehr im Gebiet der Statistik abgemacht sein, während Sommerrückfälle derjenigen Arbeiter, denen die Malaria die Rückkehr mehrere Jahre hintereinander nicht verekelt hat, natürlich auch in die Sommerkurve fallen.

Aehnlich setzt die Wilhelmshavener Kurve sich zusammen aus einer schwächeren Endemiekurve und einer großen Epidemiekurve unter den Erdarbeitern usw. für die Hafenbauten. Hier sind das, was die Gestalt der Sommerkurve ganz und gar beherrscht, einige wenige Epidemiejahre mit vielen tausend Fällen während der Hafenbauten, also in einer stark wechselnden Bevölkerungsgruppe. Ein Ausdruck des Epidemieganges in diesem ausschlaggebenden Bevölkerungsanteil zeigt Reihe I. Die 8 Proz. Quartana. die nach Wenzel sich auf die vier Quartale, wie folgt, verteilen, 335, 286, 302, 572, erhöhen besonders die Zahlen im Herbst. Bei dieser Auffassung würde sich in allen 5 Kurven, so verschieden sie auch aussehen, doch dasselbe Grundgesetz der Malariaepidemie ausdrücken. Sie würden nur beweisen, daß, wenn man nicht die Zusammensetzung der Bevölkerung, auf die sich eine Statistik bezieht, genau berücksichtigt, eine richtige Beurteilung derselben nicht möglich ist, daß also Zahlen und Kurven allein nicht geeignet sind, epidemiologische Gesetze aufzudecken.

Die um uns herumliegenden Länder verhalten sich durchaus dem unsrigen entsprechend, wie die Zahlenreihen VI aus Galizien, VII aus den Niederlanden, VIII aus Oesterreich zeigen. Wenn die Wiener Klinik einen zweiten kleineren Malariagipfel zeigt, so könnte der entweder auf Tropica bezogen werden oder auch auf Quartana, vgl. unten, welch letztere in jener alten Zeit noch einen erheblichen Anteil an der Malariaepidemie der kühleren Länder hatte. Auch die schwedischen Kurven zeigen in der neueren Zeit einen reinen Frühjahrs-(Mai-) Gipfel, ebenso die dänischen, während ältere schwedische Kurven noch einen zweiten Herbstgipfel erkennen lassen, den Flensburg auf die Beimischung der damals noch häufigen Quartana zurückführt, welche besonders im Herbst blühe.

Verschiedene Erklärungen der Frühjahrsgipfel sind versucht:

1) Infiziert durchwinterte Anophelen dürften nicht häufig sein. Die Lebensdauer der Malariakeime in den Mücken ist nach den vorliegenden Beobachtungen nicht groß genug, daß sie den deutschen Winter überstehen könnten. Sie sind am Balkan sicher lange ausgestorben, wohl über 1 Monat, wenn die Hauptzeit der Frühjahrserkrankungen einsetzt. Diese Theorie entbehrt also jeder tatsächlichen Grundlage.

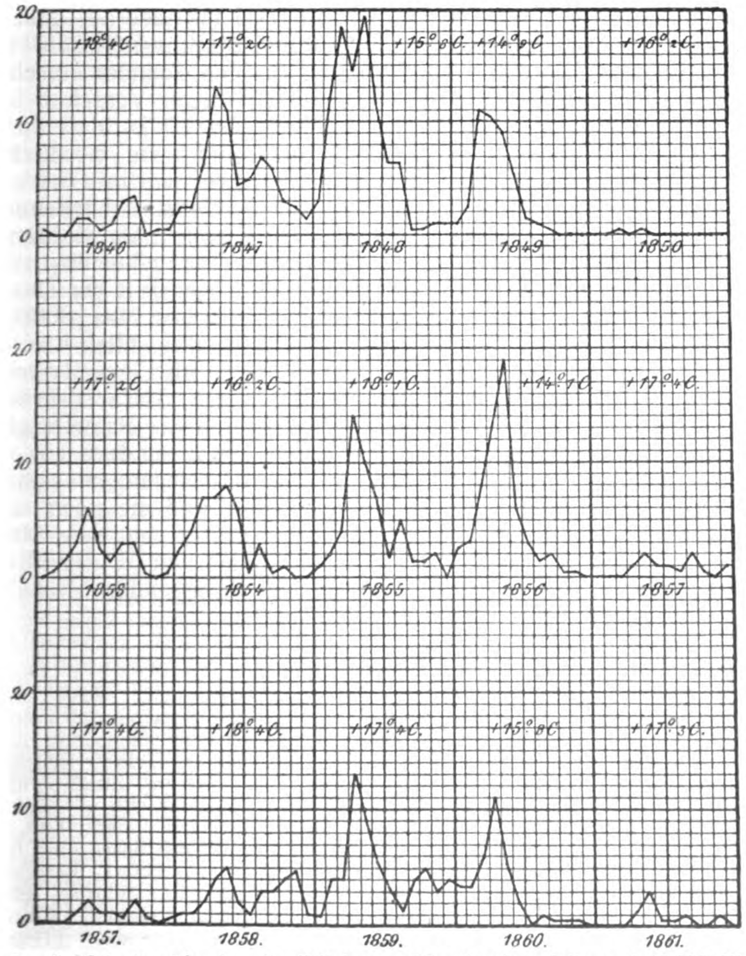
2) Koch führte die Frühjahrsmalaria auf ein künstliches warmes Klima in den Wohnungen zurück. Aber ganz abgesehen davon, daß dies in Süddeutschland und gleichen Breiten sicher im Mai und Juni nicht mehr besteht und in Ländern, wie Mazedonien, mit typischer Frühjahrstertiana überhaupt kaum zustande kommt, sprechen auch Swellengrebels Untersuchungen in Holland über infizierte Anophelen in den Häusern dagegen, daß die Malariaerkrankungen im März bis Juni von ihnen herrühren könnten, und es ist, wenn man die ganze Literatur durchsieht, vielleicht hie und da ein einzelner Fall bekannt geworden, wo die Infektion im Winter im warmen Zimmer zustande gekommen sein muß, aber keiner, wo irgend auch nur eine kleine Epidemie auf diese Ursachen mit Sicherheit zurückgeführt wäre.

Daher kann ich es auch nicht gelten lassen, wenn Ziemann folgert, in Schweden gibt es einen Frühjahrsgipfel der Malaria im Mai, folglich wirkt sich auch dort ein künstlich warmes Klima aus. Vielmehr hat Bergmann (zitiert nach Flensburg) schon längst bewiesen, daß die Ansteckungen der Malaria in Schweden in den Hochsommer, die Erkrankungen ganz überwiegend ins Frühjahr fallen. Dies Verhältnis ist auch den finnischen Aerzten wohl bekannt gewesen. Es ist erst der modernsten Wissenschaft vorbehalten gewesen, diesen Tatbestand zu verschleiern.

Bergmann hat ihn belegt durch eine ganze Anzahl Fälle, in denen Truppenteile im Sommer vorübergehend in eine malariaverseuchte Garnison gekommen waren, im Herbst wieder an ihren malariafreien Standort zurückkehrten und im nächsten Frühjahr von einer heftigen Malariaepidemie befallen wurden, welche jedoch die Zivilbevölkerung usw. nicht ergriff.

Ich verweise nur auf 2 ausgewählte Fälle. 1839 war eine Abteilung des Dalregimentes von 500 Mann nach Vaxholm kommandiert, einem damaligen Malariaort, von wo sie Ende September und Anfang Oktober desselben Jahres zurückkehrten. Im April und Anfang Mai des folgenden Jahres erkrankten nicht weniger als $^7/_8$ dieser Mannschaft an Wechselfieber, während die anderen Teile des Regimentes, die dem Kommando nicht angehört hatten, und die Zivilbevölkerung nicht unter Malaria litten. 2) In Kristianstad, einem alten berüchtigten Malariaort, wütete die Malaria 1848 besonders schwer unter den Mannschaften des dorthin verlegten wendischen Artillerieregimentes. Im selben Jahre waren während des Sommers 400 Mann des Regimentes nach Landskrona abkommandiert, von wo sie Ende August und in den ersten Tagen des September zurückkehrten. Im folgenden Frühjahr brach die Malaria aufs neue in Kristianstad aus, wobei sich bemerkenswerterweise zeigte, daß die Mannschaften, die im Sommer vorher sich in Landskrona aufgehalten hatten, nicht an Malaria erkrankten, während der übrige Teil des Regimentes, der zu Hause geblieben war, ziemlich allgemein davon befallen wurde. Ich glaube, diese beiden Beispiele allein genügen zum Beweis, daß die Frühjahrsmalaria praktisch aus-

schließlich auf Infektionen im Sommer zurückzuführen ist, wenigstens in Schweden. Nach der obenstehenden Erörterung der deutschen Kurven gilt dasselbe auch für das deutsche Malariajahr. Nur mit dieser Auffassung ist es auch möglich, die Tatsache zu verstehen, daß das eine Malariaepidemie beginnende Jahr meist auf einen warmen Sommer **folgt**, und daß das letzte Epidemiejahr meist einen kalten Sommer hat (vgl. Fig. 1). Doch will ich dabei nicht verweilen.



Kurve 1. 3 **Malariaepidemien** in Göteborg. **Krankenhausfälle** auf 10 000 **Einwohner.**

Danach haben also alle Malariaepidemiekurven nördlich der Alpen bei ungestörter Bevölkerung den Gipfel im Mai oder Juni. Nur unter besonderen Verhältnissen, die zur Verschiebung größerer Menschenmengen führen, treten die Abweichungen von dieser Regel aus leicht durchsichtigen Gründen auf. Dieser Kurvenverlauf beruht darauf, daß zwar die Infektionszeit der Sommer ist (Juli, August, September), sehr viele, vielleicht die meisten Infektionen aber eine lange, 6 Monate und mehr dauernde Inkubation haben, so daß die Erkrankung erst im

Frühjahr auftritt, während gleichzeitig zahlreiche Rezidive erscheinen.

Bemerkenswert und mit dieser Theorie nicht stimmend sind die Doppelgipfel der Rezidivkurven in Mittel- und Süditalien. In diesen Gebieten aber mit dichter Tertiana und zum Teil kräftiger Chininbehandlung muß man auf zahlreiche Reinfektionen rechnen, und es ist wahrscheinlich möglich, den Wiederanstieg der anscheinenden Rezidivkurven einfach auf Konto von Reinfektionen zu buchen. Dann würde allerdings der Herbstgipfel den des Frühjahrs weit übertreffen und die Kurve ihr Maximum im August haben. Das ist aber der natürliche Habitus bei intensiver Behandlung, die die Frühjahrsrückfälle natürlich drückt, dagegen die Zahl der Immunen für den Sommer einschränkt und damit einer erhöhten Epidemiebildung im Sommer Vorschub leistet. Unsere Kriegserfahrungen am Balkan zeigen gleichfalls, daß auch im südlichen Klima dieselben Verhältnisse herrschen wie nördlich der Alpen, und im Malariagebiet Rußlands glaubt man, wie uns Swellengrebel berichtet, das gleiche epidemiologische Gesetz anerkennen zu müssen. Boyd erwähnt von den englischen Truppen am Balkan dasselbe. 1916, nachdem die Truppen im Spätherbst gekommen waren, gab es von Januar bis Mai 50 Fälle, im Juni 90, von Juli bis Dezember 30000; bei den Truppen, die dort blieben, 1917 bis Mai 8000, eine Division dagegen, die im Winter neu gekommen war, blieb frei.

Die vorstehenden Ausführungen haben nicht nur den Zweck, die anscheinenden Unstimmigkeiten in den deutschen Malariakurven zu klären und zu zeigen, in wie einfacher Weise sich die Schwierigkeiten beheben und das allgemeine Grundgesetz klar wird, sondern sie wollen auch dieses letztere betonen. Denn in den Erörterungen selbst berufendster Verfasser bemerke ich immer wieder, daß sie noch eine zu innige Abhängigkeit des Malariaganges im Jahre von den Mückenverhältnissen annehmen und der Eigenwilligkeit der Plasmodien im menschlichen Körper bei der Beurteilung der vorliegenden Verhältnisse nicht den nötigen Raum geben.

Literatur.

Beckmann, 1891. Die Malaria in Kiel. (Dissertat.) Kiel 1891. — Bergmann (zitiert nach Flensburg). — Boyd, The principles of prophylaxis of malaria: with the administrative and other mesures for their application on active service. Il R. Army Med. Corps. Vol. 43. 1924. p. 95. — Dose, Beiträge zur Medizinischen Statistik. Bd. 3. 1878. S. 65. — Flensburg, Studien über die Malaria. Nord. Med. Archiv. Bd. 45. Abt. II. Heft 4. 1912. Nr. 15. — Grawitz, Epidemiologische Beiträge zur Frage der Malariainfektion. Berl. klin. Woch. Bd. 21. S. 521. — Hussa, Beiträge zur Statistik der Wechselfieber und Lungenentzündungen. Ztschr. d. Wien. Aerzte. 1859. S. 647. — Martini, Berechnungen und Beobachtungen zur Epidemiologie und Bekämpfung der Malaria. Hamburg (Gente) 1921. — Mayer, Zur Epidemiologie der Malaria. Dtsch. Militärärztl. Zeitschr. Bd. 29. 1900. S. 497. — Mayr, Malaria in Erlangen. [Dissertat.]. Erlangen 1889. — Swellengrebel, De Reis der Malaria-Commissie van den Volkenbund naar Oost-Europa en Italië. Nederl. Tijdschr. v. Geneesk. Bd. 69. 1925. S. 218—228. — Thomas, Arch. f. Heilk. Bd. 7. 1866. S. 225, 889, 385. — Wenzel, Prag. Vierteljahrsschr. f. d. ges. Heilk. Bd. 4. 1870. S. 1. — Weydemann, Malaria im nördlichen Jeverlande. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 43. 1907. H. 1). — Ziemann, Malaria. Menses Handbuch. Bd. 3. 1924.

Zur Frage über einige morphologische Besonderheiten der Parthenogenese und die Bedeutung derselben bei den späteren Rezidiven der Malaria.

[Aus der Klinik für Infektionskrankheiten der I. Mittel-Asiatischen Staatsuniversität. Taschkent. (Vorstand Prof. A. G. Alexieff).]

Von Dr. **P. F. Samsonoff.**

Mit 1 Tafel.

Schon 1912 hat Schaudinn seine Theorie der parthenogenetischen Vermehrung der Makrogametozyten begründet, welche die Entstehung der späteren Malariarezidive dadurch erklärte, daß in den inneren Organen 48 Std. vor dem Anfalle durch ungleiche Abschnürungen eines Plasma- und Kernteiles von den Makrogameten von Plasm. vivax eine Schizogonie zustande kommt, wobei die abgeschnürten Teile wahrscheinlich nachher zugrunde gehen, während die neugebildeten Schizontenstämme Malariaanfälle hervorrufen. In seinen späteren Arbeiten stellt Schaudinn den Prozeß der Parthenogenese nicht mehr so einfach dar, indem seiner Meinung nach die normale Befruchtung durch Autogamie ersetzt wird, wobei der Reduktionskern mit dem reifen Makrogametenkern zusammenschmilzt.

Die Theorie Schaudinns wurde bekanntlich von einer Reihe von Zoologen und Malariaforschern anerkannt, wie z. B. Hartmann und Schilling (1917), v. Prowazek, Ruge (1913), Nocht (1909), Marchou (1917), Schaedel (1918) u. a.; gleichzeitig aber verhielten sich Craig (1910), James (1913), Ziemann (1918, 1920), Mühlens (1921) u. a. dieser Theorie gegenüber zurückhaltend, ja sogar negativ und behaupteten, daß diese Theorie mangelhaft begründet und auf Grund falsch gedeuteter Beobachtungen entstanden sei. So meint James, daß die parthenogenetische Vermehrung der Makrogameten in Wirklichkeit nur die atypische Teilung der Schizonten darstelle, während andere behaupten, daß diese Formen doppelt mit Schizonten und Gameten infizierte Erythrozyten seien. Dieses Verhalten fand gewissermaßen seine Begründung in den Arbeiten von Hilst-Karseweg (1907) und Blüm und Metz (1908). Diese zeigten, daß die Parthenogenese nicht obligatorisch vor dem Anfall, sondern auch während desselben verlaufen kann, und zwar nicht nur bei Rezidiven, sondern auch bei unzweifelhaft frischen Malariaanfällen, wobei die parthenogenetischen Formen der Makrogameten im peripheren Blute gleichzeitig mit einer großen Anzahl der Schizonten auftraten.

Blüm und Metz weisen zum erstenmal auf den Umstand hin, daß bei der parthenogenetischen Entwicklung eines Elementes gleichzeitig ein Schizont und eine Gamete resultieren.

Mühlens (1920, 1921), Ziemann (1920) und besonders Simons (1919) haben zuletzt in einer Reihe von Arbeiten nachgewiesen, daß im fieberfreien Zustande im peripheren Blute wie auch in inneren Organen lange Zeit hindurch fortwährende Schizogonie andauert, weshalb die späteren Rezidive in den meisten Fällen durch Steigerung der Schizogonie, die durch irgendwelche Einflüsse begünstigt wird, hervorgerufen werden; nur der kleinere Teil der Rezidive verdankt der parthenogenetischen Entwicklung seinen Ursprung.

Der unten angeführte, von uns beobachtete Fall der Parthenogenese zeichnete sich durch manche Besonderheiten aus, über welche wir in der Malarialiteratur keine Angaben finden.

Wir fertigten Blutausstrichpräparate von einem 3jährigen Knaben auf der Höhe eines Malariaanfalles an, der sich nach langer fieber-

loser Periode einstellte. Der Kranke litt im Herbst 1922 in Chiwa an hartnäckiger Malaria. Der letzte Anfall trat im November ein. In der Zwischenzeit vom November 1922 bis Mai 1923 waren keine Malariaanfälle zu beobachten. Der Knabe besaß eine große, harte Milz, die 3 Querfinger unter dem Rippenbogen tastbar war. Am 7. 5. 1923 stellte sich plötzlich ein schwerer Malariaanfall ein[1]). Bei der Untersuchung der Präparate fanden wir gleichzeitig die Parasiten von Plasmodium vivax und immaculatum. Die Zahl des Plasmodium vivax war verhältnismäßig groß, und wir konnten dabei alle Stadien der geschlechtslosen Entwickelung der Parasiten beobachten von soeben eingedrungenen Merozoiten an bis zu sporulierenden Schizonten. Die Mehrzahl aller Formen befand sich im halberwachsenen Entwicklungsstadium. Von 100 Parasiten fielen 18,5 Proz. auf junge Ringformen, 81 Proz. auf halberwachsene Schizonten und nur 0,5 Proz. auf fertige Teilungsformen.

Plasmodium immaculatum war nur in sehr spärlicher Zahl und nur in Form von Gametozyten zu finden.

Das Verhältnis von Gametozyten des Plasm. vivax zu den Schizonten war 1:12.

Bemerkenswert war das Ueberwiegen von männlichen Formen der Gametozyten weiblichen gegenüber, wobei das Verhältnis ♂:♀ 4:1 war.

Die Verhältniszahlen für die Gametozyten von Plasm. immaculatum waren infolge ihrer geringen Zahl nicht festzustellen.

Verhältnismäßig häufig war Doppelinfektion von Erythrozyten mit Plasm. vivax. Von 100 infizierten Erythrozyten waren 17 Proz. doppelt und 83 Proz. einfach infiziert. Ein Erythrozyt war sogar gleichzeitig mit 6 jungen Formen infiziert (siehe Blüm und Metz). In den Fällen von Doppelinfektion befanden sich nicht alle eingedrungenen Parasiten im gleichen Entwicklungsstadium, wie z. B. 2 halberwachsene Schizonten, 2 junge Ringformen, 1 reifer Schizont und Gamete, sondern es fanden sich auch Formen, wo nebeneinander 1 reifer Gametozyt mit 1 oder 2 Merozyten, oder junge Ringformen, welche im freien Abschnitte des Erythrozyten lagen, sich entwickelten. Mit 2 Gametozyten von gleichem oder verschiedenem Geschlecht gleichzeitig infizierte Erythrozyten waren selten anzutreffen.

Außer den oben erwähnten Formen waren auch typische Makrogametozyten mit allen charakteristischen Kennzeichen einer Parthenogenese zu finden. In unseren Präparaten konnten wir alle Stadien der intimen Aenderungen sowohl im Kernapparate wie auch im Plasma der Makrogametozyten fast bis zum Endmoment der Entwicklung verfolgen. Das Wesen des Prozesses wie auch seine Folgerichtigkeit lassen sich am besten aus den Abbildungen (s. Abb. 1—9) ersehen. Diese enthalten auch entsprechende Erklärungen, die, um Wiederholungen zu vermeiden, nicht weiter im Texte erwähnt werden.

Die Einzelheiten der parthenogenetischen Vermehrung fallen im allgemeinen mit den Beschreibungen von Schaudinn zusammen. Was aber den Kern des Makrogametozyten anbetrifft, welcher an der Schizogonie keinen Anteil nimmt, so waren wir nicht immer imstande, die nach Schaudinn charakteristischen Aenderungen, wie Aufquellung und vermutliche Auflösung desselben, zu bemerken. In der Mehrzahl aller

1) Zur Zeit unseres Verweilens in Chiwa beobachteten wir von April bis Anfang Juni nur rezidivierende Malariaformen. Frisch infizierte Malariaanfälle waren erst später anzutreffen.

Fälle fiel der Kern nach dem Typus der Karyorhexis auseinander, oder er zeigte überhaupt keine degenerativen Aenderungen. Für diesen letzten Fall sind unserer Meinung nach die Anschauungen von Blüm und Metz richtig, die glauben, daß die Parthenogenese der Makrogameten die Bildung eines Schizonten und einer Gamete zur Folge hat. Diese Formen — bei welchen nur die Abschnürungen des Plasmas zu bemerken sind, während ein Kernteil bei der Vorbereitung zur Schizogonie sich teilt und der andere keine degenerativen Aenderungen zeigt, um nachher wahrscheinlich als Gametenkern zu fungieren — führen mit Recht den von Lühe ihnen verliehenen Namen „Gametoschizonten" (s. Abb. 8 und 9).

In anderen Fällen macht der lockere, blaßgefärbte Kern in der Tat keine karyolytischen Prozesse durch, sondern geht zugrunde, indem er in 2 oder mehrere ebenso lockere Klümpchen zerfällt (s. Abb. 6 u. 7).

Bei den parthogenetisch sich entwickelnden Makrogameten, besonders bei den Anfangsstadien derselben, war die heteropolare Mitosis (sens. Schaudinn) mit dem Kernzerfall in 2 ungleiche und verschieden sich färbende Kerne nicht immer zu beobachten; manchmal sahen wir eine Kernteilung in 2 gleichgefärbte Abschnitte (s. Abb. 10 und 11); der eine von ihnen wird bei weiterer Entwicklung, ohne sich zu verändern, entweder zum Kern einer Gamete, welche sich nach dem Zerfall eines „Gametoschizonten" bildet, umgestaltet, oder beide Kerne werden in den Teilungsprozeß hineingezogen, wobei Formen zum Vorschein kommen, wie sie in Abb. 12 dargestellt sind, die man auf den ersten Blick mit den sich atypisch teilenden Schizonten verwechseln kann. Diese Aehnlichkeit hat James auch dazu verleitet, die sich parthenogenetisch teilenden Gameten für atypische Schizonten zu halten.

Endlich haben wir in manchen Makrogametozyten Kernbildungen beobachtet, die man als chromatine Reduktionskörner betrachten kann, soweit es überhaupt erlaubt ist, nur auf Grund der fixierten Blutstrichpräparate davon zu sprechen (s. Abb. 13, 14, 15 und 16). In manchen Fällen liegen die reduzierten Chromatinkörner entweder am Rande des Zelleibes (Abb. 13 u. 15), oder sie zeigen alle Kennzeichen eines Teilungsprozesses (Abb. 14). Einmal sogar beobachteten wir ein Chromatinkorn, das neben dem geteilten Kerne einer Makrogamete lag (Abb. 16)[1]).

Im allgemeinen kann man bei dem letztgenannten Prozesse keine strenge Einförmigkeit feststellen: das chromatische Reduktionskorn kann früher oder später sich teilen; die Kernteilung erinnert dann manchmal an eine heteropolare Mitose (Abb. 13 u. 14), in anderen Fällen aber nicht; der Kern teilt sich nicht synchron, weshalb Formen mit 3 Kernen zum Vorschein kommen können (Abb. 16).

Alle diese parthenogenetisch sich entwickelnden Makrogameten kann man sehr leicht mit den Formen einer Doppelinfektion des Erythrozyten mit dem Schizonten und einer Gamete verwechseln, und zwar besonders dann, wenn beide Parasiten zu dicht aneinander liegen, daß jede Grenze zwischen ihnen verschwindet. Aus den Abbildungen sind solche Formen deutlich ersichtlich (Abb. 17, 18, 19 u. 20).

Das Gesagte resumierend, müssen wir erklären: Die parthenogenetische Entwicklung der Makrogameten gestaltet sich nicht so ein-

1) Die letzte Form ist als Anfang der Autogamie zu betrachten.

fach, wie es anfangs von Schaudinn angenommen wurde. Allem Anscheine nach verläuft dieser Prozeß in Wirklichkeit nach einem der 3 Typen:

1) Der Makrogametenkern teilt sich in 2 Kerne; der eine von diesen rückt samt abgeschnürtem Plasmateil gegen die Peripherie hin, wo er sekundäre reife Gameten bildet; der andere Kern aber bildet nach einigen Teilungen Merozoitenkerne. Dieser Typus ist der echte „Gametoschizont" von Lühe und fällt auch mit der Interpretation von Blüm und Metz zusammen. — 2) Der eine von beiden Kernen (von blasserer und lockererer Struktur) degeneriert auf dem Wege der Karyolysis oder Karyorhexis. Dieser Prozeß deckt sich ziemlich mit der Anschauung von Schaudinn (in seiner 1. Version), obwohl wir eine deutliche Abschnürung des degenerierenden Kernes samt dem betreffenden Plasmateile niemals beobachteten. Es kommt hier also die Chromatinreduktion zustande, doch ohne Bildung vom kompletten Polkörperchen. — 3) Der Kern verliert 2 Chromatinkörner und beginnt sich wiederholt zu teilen, um die Merozoitenkerne zu bilden. Der letztere Prozeß ist bis jetzt noch nicht beschrieben worden; seinem Anfang nach erinnert er an die Autogamie, die seinerzeit bei dem Entwicklungszyklus der Protozoen so oft geschildert wurde.

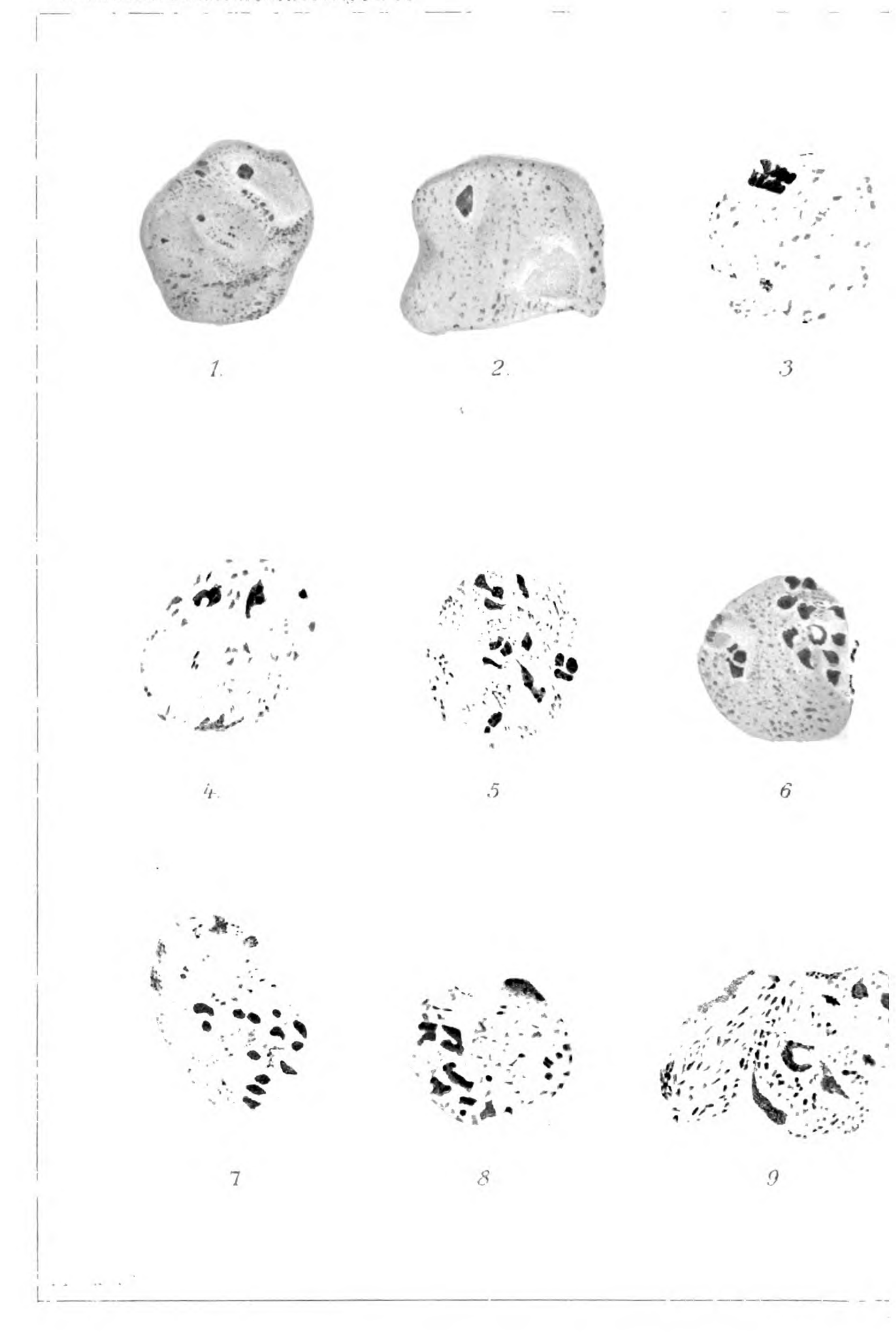
Ich bemerke, daß die Abtrennung eines schizogonischen Teiles bei der Entwicklung nach dem Typus eines „Gametoschizonten" als Reifung einer Gamete und die nachfolgende Bildung der Merozoiten als Teilung und Entwicklung des Polarkörperchens betrachtet werden können.

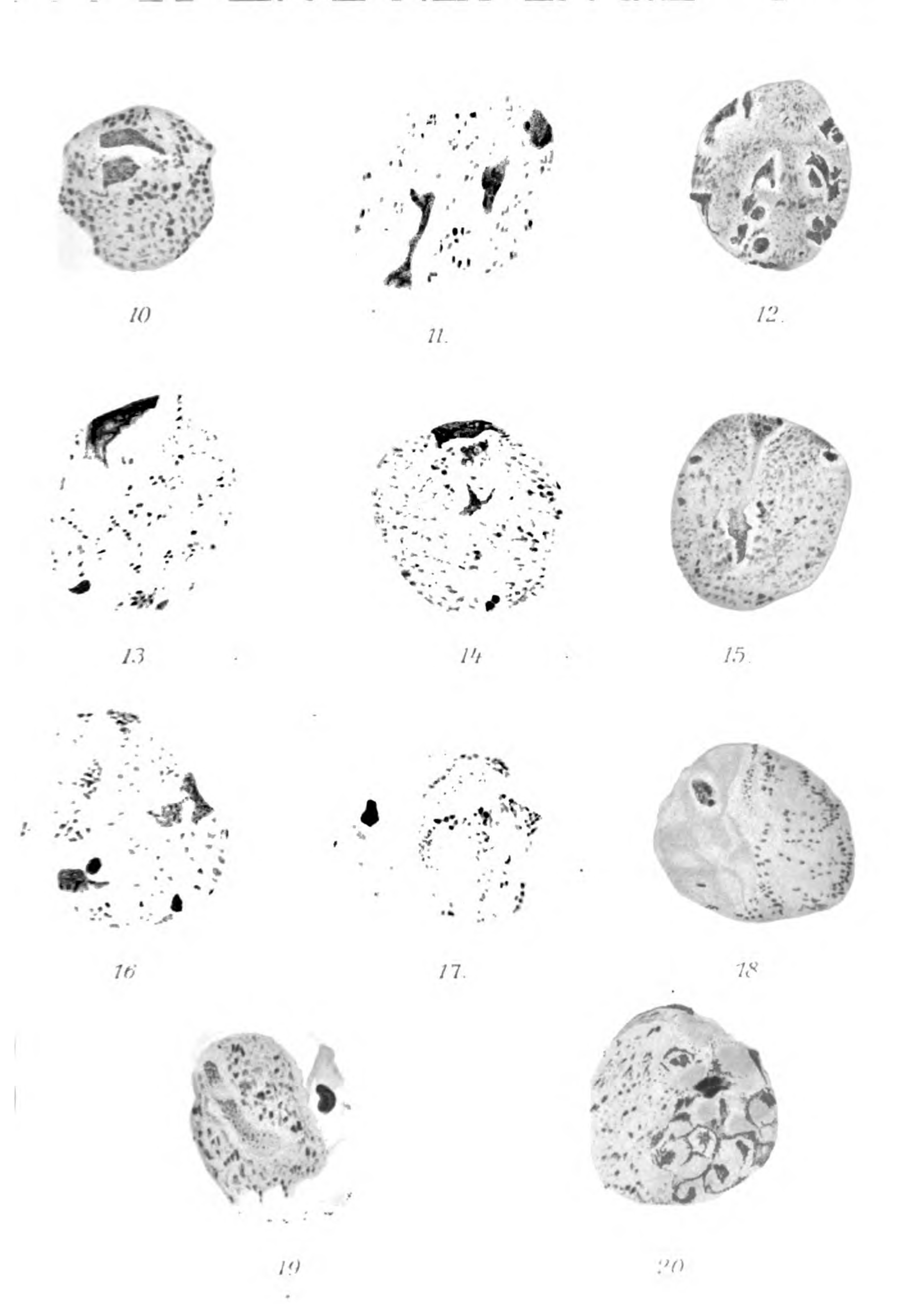
Was die Bedeutung der Parthenogenese bei den späten Malariarezidiven anbetrifft, so können wir in unserem Falle, wo auf der Höhe eines Malariaanfalls gleichzeitig Schizonten und parthenogenetische Gameten angetroffen wurden, zu keinem endgültigen Schluß kommen, weil die Bedeutung der letzteren erst dann hervorgehoben werden kann, wenn sie, wie Bates (1913) richtig betont, nur mit Gameten, ohne Schizonten, zum Vorschein kommen. Dadurch wird allerdings die Möglichkeit einer Parthenogenese bei dem Entwicklungszyklus eines Malariaparasiten im allgemeinen durchaus nicht ausgeschlossen.

Wir sind mehr zur Annahme geneigt, daß in unserem Falle die Rezidive durch die für einen Anfall genügende Vermehrung der Schizonten zustande gekommen ist, wobei die letzteren auf dem Wege der Parthenogenese in den inneren Organen entstanden sind; die parthenogenetischen Makrogametozyten, welche gleichzeitig mit Schizonten im peripheren Blute vorkommen, sind zur Zeit des Anfalls in die allgemeine Blutbahn geraten und erscheinen somit als letzte Vertreter dieser Formen, welche ihre Entwicklung nicht bis zum Ende zu bringen vermochten.

Diese letzte Erwägung wird noch dadurch verstärkt, wie auch oben vermerkt, daß die perzentuelle Wechselbeziehung zwischen den Schizonten und Gametozyten sowie das Ueberwiegen der männlichen Formen unter den letzteren für den Anfang einer Malariainfektion nach Ruge (1913), Simons (1919) und Mühlens (1921) charakteristisch ist.

Ohne zu wagen, die Frage der Bedeutung der Parthenogenese bei der Entstehung der Frühjahrsrezidive endgültig zu lösen, bin ich nichtsdestoweniger geneigt, nochmals zu unterstreichen, daß dieser Prozeß in dem Entwicklungszyklus des Plasmodium vivax seinen Platz


1.
2.
3
4.
5
6
7
8
9


10
11.
12.
13
14
15.
16
17.
18
19
20

einnimmt, indem sein Verlauf variierenden Charakter hat und entweder Gametoschizonten oder nur Schizonten liefert[1]).

Erklärung der Tafelabbildungen.

Alle Figuren sind mit Zeichenkammer von Zeiß angefertigt, projiziert auf den Tisch; Zeiß' Obj. 2 mm. Die Nummern des Komp.-Okul. sind bei jeder Figur besonders angegeben. Die Blutausstrichpräparate sind auf trockene Weise hergestellt und gefärbt nach Leishman und Giemsa-Romanovsky.

Fig. 1 (Komp.-Okul. 12). Der Kern teilte sich auf dem Wege der heteropolaren Mitose in 2 Kerne: einen kleinen, chromatinreichen und einen großen, chromatinarmen.

Fig. 2 (Komp.-Okul. 12). Die Kerne rückten in die entgegengesetzten Abschnitte der Gamete auseinander. Der große Kern ist noch mehr aufgequollen.

Fig. 3 (Komp.-Okul. 12). Der kompakte Kern teilte sich in 2 geformte Tochterplättchen. Der chromatinarme Kern, der an der beginnenden Schizogonie nicht teilnimmt, nahm augenscheinlich eine mißgestaltete, krummgebogene Fadenform an. Man bemerkt die Einschnürung des Plasmas.

Fig. 4 (Komp.-Okul. 12). Die weitere Teilung des anfänglich kleinen Kernes führt zur Schizogonie.

Fig. 5 (Komp.-Okul. 12). Die parthenogenetische Entwicklung der Makrogamete, welche bloß zur Schizontenbildung führt. Der große Kern ist wenig bemerkbar; stark degeneriert, kommt er nur in Form eines dünnen, schwach gefärbten Fadens zum Vorschein.

Fig. 6 (Komp.-Okul. 8). Die gleiche Form, wie in Fig. 5. Der chromatinarme Kern, welcher an der Schizogonie keinen Anteil nimmt, im Gegensatz zu solchen Kernen bei vorhergehenden Formen (Fig. 3 u. 5), zerfällt in 2 blasse Chromatinklümpchen. Die im rechten Abschnitte der Gamete sich teilenden Kerne sind in wabiges Plasma eingebettet.

Fig. 7 (Komp.-Okul. 12). Die Form ist den vorhergehenden ähnlich. Die Teilung des anfänglich kleinen, kompakten Kernes ist beendet; es resultieren 13 vollständig geformte Kerne der künftigen Merozoiten. Der chromatinarme Kern zerfällt, wie in der Fig. 6, in einige blasse Klümpchen[2]).

Fig. 8 (Komp.-Okul. 8). Der typische Gametoschizont nach Lühe. Der Kern, welcher an der Schizogonie keinen Anteil nimmt, trägt nicht mehr degenerative Zeichen an sich und liegt schon an der Peripherie, was für die Gamete charakteristisch ist.

Fig. 9 (Komp.-Okul. 18). Das weitere Stadium der Entwicklung eines Gametoschizonten; man bemerkt deutlich ausgeprägte Einschnürung des Plasmas in 2 ungleiche Teile bei der noch fortdauernden Kernteilung in der rechten Hälfte der Gamete; in der linken Hälfte, wo der Kern an der Schizogonie keinen Anteil nimmt, bemerkt man eine Pigmentanhäufung, angeordnet in der für Gametozyten charakteristischen Weise (in einer Richtung ausgezogen).

Fig. 10 (Komp.-Okul. 8). Makrogametozyt mit 2 Kernen, wobei der obere von ihnen im Stadium eines äquatorialen Plättchens sich befindet.

Fig. 11 (Komp.-Okul. 18). Makrogametozyt mit 2 Kernen; beide Kerne sind in den Teilungsprozeß einbezogen.

Fig. 12 (Komp.-Okul. 12). Fortsetzung eines Teilungsprozesses der Gametenkerne; die Form mit 19 Kernen, gleichmäßig verteiltes stäbchenförmiges Pigment, spricht durchaus zugunsten der Entstehung dieser Form aus der Gamete.

Fig. 13 (Komp.-Okul. 18). 1. Kernteilung auf dem Wege der heteropolaren Mitose nach der Chromatinreduktion. 2 Chromatinkörner liegen an der Peripherie des Gametozyten.

Fig. 14 (Komp.-Okul. 18). Ein Makrogametozyt mit heteropolarer Mitose des Kernes. Der Reduktionskern teilte sich in 2 Abschnitte, welche an der Peripherie des Zelleibes liegen.

Fig. 15 (Komp.-Okul. 18). Form mit Teilung eines Kernes in 2 gleichgroße und gleichgefärbte Abschnitte. 2 chromatine Reduktionskörner liegen an der Peripherie.

Fig. 16 (Komp.-Okul. 18). Form mit 3 Kernen und 2 Reduktionskörnern, von denen das eine mit dem geteilten Kern eines Gametozyten nebeneinander liegt (Anfang der Autogamie?).

1) Zum Schlusse halte ich es für meine Pflicht, dem hochgeehrten Prof. A. G. Alexeieff für seine wertvollen Weisungen und Ratschläge bei der Herstellung der vorliegenden Arbeit meinen Dank auszusprechen.

2) In den Figg. 4, 5, 6 und 7 tritt keine Plasmaeinschnürung auf.

Fig. 17 (Komp.-Okul. 18). Doppelinfektion eines Erythrozyten mit Makrogameten und mit halberwachsenem Schizonten. Zwischen ihnen ein undeutlicher Spalt.

Fig. 18 (Komp.-Okul. 18). Gleiche Form ohne merkbare Grenze zwischen den Parasiten.

Fig. 19 (Komp.-Okul. 12). Doppelinfektion eines Erythrozyten mit einem Mikrogametozyten und einem jungen Schizonten.

Fig. 20 (Komp.-Okul. 18). Doppelinfektion mit einem sporulierenden Schizonten und einer Gamete.

Bei den Formen in Fig. 17, 18, 19 und 20 besteht ein scharfer Unterschied in der Pigmentverteilung und in der Plasmafärbung.

Literatur.

Bates, J. P., Relapse in Malaria. (Journ. of Trop. Med. a. Hyg. 1913. Nr. 16 [zit. nach Mühlens 1921].) — Blüm, M., u. Metz, G. F., Schizogonie der Makrogameten. (Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. 1908. S. 249.) — Craig, Ch. F., The sexual forms of the malaria plasmodia occuring in the blood of man. (Arch. Int. Med. und Journ. Inf. Dis. 1910 [zit. nach Mühlens 1921].) — Hartmann, M., u. Schilling, Die pathogenen Protozoen. 1917. — Hilst-Karseweg, J., Geneesk. Tijdschr. v. Ned.-Ind. D. 47. 1907 (zit. nach Mühlens 1921). — James, W. M., Notes on the etiology of relapse in malarial infections. (Journ. Inf. Dis. Vol. 12. 1913. Nr. 3 [zit. nach Mühlens 1921].) — Marchou, F., Bull. Acad. Méd. T. 78. 1917. Nr. 31. — Mühlens, P., u. a. Münch. med. Wochenschr. 1920. Nr. 29. — Mühlens, P., Die Plasmodien. 1921. — Nocht, B., Die Therapie der Malaria. (Dtsch. med. Wochenschr. 1909. Nr. 12.) Ruge, R., Die Malariaparasiten. (Handb. d. pathog. Mikroorg. v. Kolle-Wassermann. 1913.) — Schaudinn, F., Plasmodium vivax, der Erreger des Tertianfiebers beim Menschen. (Arb. a. d. Kais. Ges.-Amt. Bd. 19. 1902. S. 169.) — Schaedel A., Biol. Betrachtungen zur Frage der Malariarezidive und Malariaverbreitung. (Biol. Centralbl. Bd. 38. 1918.) — Simons, H., Malariafragen und kritische Studien über den Unitarismus. (Berl. klin. Wochenschr. 1919. Nr. 43 u. 44.) — Ziemann, H., Die Malaria. (Handb. d. Tropenkrankh. 1918.) — Ders., Ueber wichtigere Probleme der modernen Malariaforschung. (Berl. klin. Wochenschr. 1920. Nr. 28/29.)

Ein Beitrag zur Wassermannschen Reaktion bei Malaria.

[Aus der klin.-diagnost. Abteilung des Tropeninstituts in Staraja Buchara (Direktor: Dr. L. Issaew, Abt.-Leiter: Dr. Asbelew).]

Von Dr. **W. N. Asbelew.**

Schon Michaelis, Lesser und Boehm haben über das Vorkommen der positiven WaR. bei Malaria berichtet. Seitdem ist diese Frage in einer Reihe zum Teil sich widersprechender Arbeiten erörtert worden, in denen die meisten Autoren auf die Abhängigkeit der positiven Reaktion vom Vorhandensein der Parasiten im Blute und von dem Fieberanfall hingewiesen haben. Andere aber, wie z. B. Heinemann, wollen auch bei der chronischen Malaria ohne Parasitenbefund und ohne Anämie stärkeren Grades die positive Umstimmung der Reaktion beobachtet haben.

Bei der enormen Mannigfaltigkeit der Krankheitserscheinungen der Malaria und bei ihrer Ausbreitung seit den letzten Jahren in Europa bekommt diese Frage eine große praktische Bedeutung nicht nur für die endemischen Malariaherde. Da in Staraja Buchara beinahe 100 Proz.

der Eingeborenen als Träger der Malariainfektion betrachtet werden müssen, waren wir schon allein aus diesem Grunde gezwungen, uns eingehend mit dieser Frage zu beschäftigen.

Unsere Untersuchungen haben wir vom Januar 1924 an größtenteils an den Kranken des Militärlazaretts in Nowaja Buchara unter unmittelbarer Beteiligung des Herrn Dr. Petrow und zum Teil an den Kranken der klinischen Abteilung des Tropeninstituts durchgeführt. Es wurden insgesamt 295 Kranke, bei denen Syphilis in der Anamnese soweit als möglich ausgeschlossen worden war, untersucht. Das Blut wurde während des Fiebers, wie auch 1 Tag bis zu 1 Monat nach dem Anfall und in einzelnen Fällen auch noch später entnommen. Von jedem Kranken wurden am Tage der Blutentnahme für die WaR. ein dicker Tropfen und ein Ausstrichpräparat angefertigt. Die sorgfältigste Untersuchung dieser Tropfenpräparate ließen wir uns besonders angelegen sein.

Als Kontrolle benutzten wir immer die Syphilitikersera, die uns in unserer Abteilung zur serologischen Untersuchung zugeschickt wurden. Die Patienten, deren Blut zur WaR. uns aus der Stadt von den praktizierenden Aerzten zuging, wurden ebenfalls hämatologisch auf Malaria untersucht.

Wir arbeiteten nach der Original-Wassermann-Methode. Als Antigen diente uns ein Alkohol-Cholestearin-Rinderherzextrakt (Behring-Werke) und zum Teil auch das Antigen des Staatlichen Bakteriologischen Instituts des Volkskommissariats für Gesundheitswesen zu Moskau.

Von 295 Fällen hatten 161 Malaria tertiana, 101 Malaria tropica, 4 Malaria quartana, 29 Malaria chronica ohne Parasitenbefund. Da ja gerade bei uns die chronische Malaria sehr verbreitet ist, so mußten wir bei den syphilitischen Seren auf diese Tatsache Rücksicht nehmen. Die Malaria tertiana fällt zum größten Teil der (149) Fälle auf die Periode vom Februar—Juli, die tropica zum größten Teil (88 Fälle) vom August—Dezember, was mit dem örtlichen epidemiologischen Bilde im Einklang steht.

Einen positiven Ausfall der Reaktion hatten wir in 157 Fällen. Die Intensität der Reaktion ist schwächer als bei Syphilis (Tab. I).

Tabelle I.

Intensität der WaR.	±	+	++	+++	++++
Zahl der Sera	38	53	48	18	0

Wenn wir unser Material (die Malaria chronica ohne Parasiten wird weiter unten besprochen) nach den Parasitenformen verteilen

Tabelle II.

	Die Gesamtzahl	Die Zahl der positiven Fälle	Proz.
Malaria tertiana	161	97	60,2
Malaria tertiana mit positivem Parasitenbefund am Tage der Blutentnahme	125	94	75,2
Malaria tropica	101	60	59,4
Malaria tropica mit positivem Parasitenbefund am Tage der Blutentnahme	83	57	68,7

und in jeder Gruppe diejenigen Fälle mit positivem Parasitenbefund am Tage der Blutentnahme für die WaR. anzeigen, so ergibt sich vorstehendes (Tab. II, S. 115).

(Die 4 Quartana-Fälle, die auch positive WaR. geben, lassen wir hier unberücksichtigt.)

Wir sehen also, daß sowohl Malaria tertiana als auch Malaria tropica einen positiven Ausfall der Reaktion in hoher Prozentzahl geben, der noch höher wird, wenn wir nur die Fälle mit Parasitenbefund am Tage der Blutentnahme für die WaR. in Betracht ziehen. Diese Prozenterhöhung zeigt die Flüchtigkeit der WaR. bei Malaria, denn alle Fälle, bei denen am Tage der Blutentnahme keine Parasiten gefunden waren, gehören zu den akuten Fällen mit positivem Parasitenbefund 1—14 Tage vorher, in den wenigen Fällen der positiven Reaktion ohne Parasitenbefund am Tage der Blutentnahme, waren sie 2—7 Tage vorher im peripheren Blut vorhanden.

Ein Teil der trotz positiven Parasitenbefundes negativen Sera, aber durchaus nicht alle, kann dadurch erklärt werden, daß die zur Entstehung der positiven WaR. notwendige Reaktionszeit noch nicht verflossen war. So hat Meyerstein positive Reaktion am 5.—8. Tage nach Fieberbeginn beobachtet. In unserem Material sind ganz frische Erkrankungen nur einzeln vorhanden, aber wenn wir auch solche Fälle heranziehen, bei denen die positive WaR. nach einem Rezidiv entstand, das nach einigen Monaten dauernder relativer Ausheilung aufgetreten war, so sprechen unsere Beobachtungen doch dafür, daß die Sera nicht früher als am 5. Tage nach Beginn des 1. Anfalls positiv reagieren. Wir stimmen auch darüber überein, daß die WaR. durchaus nicht in allen Malariafällen erscheint, denn wir haben beobachtet, daß sie sogar hartnäckig dauernde Fieberanfälle während 2 bis 3 Wochen nicht hervorrufen konnten.

Bei der latenten und chronischen Malaria mit Parasiten kann die Reaktion positiv sein, worauf schon Hesse hingewiesen hat. Wir haben solche Fälle gesehen, wo auch bei der strengsten Analyse des Einzelfalles als Ursache der positiven WaR. nur die Malaria in Betracht kommen dürfte. Diese letzten Fälle (im ganzen nur 6) gehören zu der schweren Malaria chronica mit großem Milztumor und einzelnen Parasiten im dicken Tropfen. Viel öfter haben wir Malaria chronica mit positivem Parasitenbefund und negativer WaR. gesehen.

Bei der chronischen Malaria ohne Parasiten, mit anamnestisch ausgeschlossener Syphilis haben wir positive WaR. nicht beobachtet. Von dieser Sorte hatten wir nur 29 Fälle. Diese geringe Zahl muß aber, wie oben erwähnt, um die Zahl der Syphilisverdächtigen vermehrt werden. In dieser Kategorie hatten wir 160 Fälle mit Malaria in der Anamnese (Anfälle vor 1—12 Monaten) ohne Parasiten, die alle negatives Resultat der WaR. zeigten. Anderseits gab es wiederum Fälle, wo wir gleichzeitig bei Syphilisverdacht positive WaR. und positiven Parasitenbefund hatten. Wir fanden im Krankheitsverlauf die Bestätigung der Syphilisdiagnose, sobald nach der Chininbehandlung die Parasiten verschwunden waren und das Ergebnis der WaR. unverändert blieb.

Heinemann hat dagegen bei der javanischen Bevölkerung die positive WaR. bei der Malaria chronica leichter Natur in hoher Prozentzahl beobachtet, aber der Autor selbst sagt dabei, daß er die Analyse des Einzelfalles nicht durchführen und in keinem Falle in früherer

Jugendzeit durchgemachte Frambösie hat ausschließen können. Unser Material erlaubt den Schluß, daß die Malaria nur in der Anamnese und die Malaria chronica ohne Parasiten keine positive WaR. geben, aber wegen der großen praktischen Bedeutung dieser Frage und der Rolle, die die WaR. in der klinischen Medizin spielt, sind weitere Beobachtungen auf diesem Gebiete erwünscht.

An und für sich hat die Chininbehandlung, solange der Parasitenbefund positiv bleibt, auf den Ausfall der Reaktion keinen Einfluß.

Die WaR. bei Malaria hat meistens einen flüchtigen Charakter und ist mit dem Parasitenbefund zeitlich verbunden. Sie verschwindet manchmal auch früher als die Parasiten, aber nach ihrem Verschwinden bleibt sie nur kurze Zeit positiv. Die zeitlichen Grenzen können wir nicht deutlich feststellen. Es fehlen auch hierüber Literaturangaben. So haben Jong und Martin die positive WaR. nur während der Fieberzeit beobachtet, zwischen den Anfällen sie aber gar nicht gefunden, und Hesse sagt, daß die WaR. allmählich (in 1—2 Wochen nach dem Fieber) verschwindet. Beides trifft nur für einige Fälle zu. Die Zeit scheint von der Schwere des Krankheitsbildes abhängig zu sein.

Ich möchte hier 2 Beispiele anführen: Beispiel I: K..., Soldat (Militärlazarett), Malaria tertiana, zum 1. Male erkrankt Herbst 1922, darauf relative Ausheilung bis zum 5. 3. 1924. Milztumor 1/2 Querfinger. Ernährungszustand mittelmäßig.

10. 3. und 12. 3. Fieberanfall; 13. 3. Parasitenbefund: Agamonten pl. viv. WaR. ÷; 14. 3. Fieberanfall; 16. 3. Fieberanfall; 18. 3. kein Fieberanfall; 19. 3. Parasitenbefund: negative WaR.

Beispiel 2: W..., Mädchen, 14 Jahre alt (klin. Abteilung des Tropeninstituts) Malaria quartana. Das 1. Mal erkrankt im April 1923. Starke Anämie. Milztumor bis zum Nabel. Bei täglichem Durchsuchen des dicken Tropfenpräparates Parasitenbefund positiv bis auf den 12. 11. (letzter Fieberanfall 10. 11.). Von dieser Zeit an verschwinden die Parasiten dauernd. Die tägliche mikroskopische Untersuchung wird fortgesetzt.

30. 11. war die WaR. noch positiv (+ +) und nur am 5. 12. WaR. negativ.

Hier blieb die positive WaR. nach dem Verschwinden der Parasiten noch weiter 18—24 Tage bestehen. Das war die längste Zeit, die wir beobachtet haben; sie scheint zu den Seltenheiten zu gehören, denen man jedenfalls Rechnung tragen muß.

So hat Heinemann in einem Falle von Malaria tropica am 24. Tage nach dem Verschwinden der Parasiten eine positive WaR. beschrieben; leider sagt er nicht dabei, wie die mikroskopische Untersuchung während dieser 24 Tage durchgeführt worden war.

Der in tropischen und subtropischen Ländern so oft vorkommende atypische Verlauf der Malaria mit ihrer Vielgestaltigkeit des klinischen Bildes kann bei der serologischen Untersuchung ohne gleichzeitige eingehende mikroskopische Beobachtung tatsächlich zu einem Irrtum von weittragender Bedeutung führen. Die einzelnen Parasiten können manchmal auch im dicken Tropfen nur nach langem Suchen entdeckt werden und vielleicht dem Nachweise entgehen, daher müssen die anderen diagnostischen Hilfsmittel (wie z. B. morphologisches Blutbild) herangezogen werden, ehe man die Entscheidung trifft. In syphilisverdächtigen Fällen, wo die positive WaR. gleichzeitig mit den Malariaparasiten vorhanden ist und das Resultat der Reaktion für Syphilis keine entscheidende Antwort gibt, ist auch die serologische Untersuchung (resp. nach Malariabehandlung) zu wiederholen.

Wir wollen hier noch kurz bemerken, daß die Sera der Malariakranken, besonders in der Fieberzeit oder sofort nach dem Anfall, oft selbst antihämolytisch wirken und Hemmung im Kontrollglas hervorrufen. Diese antihämolytische Eigenschaft der Sera haben wir bei den Malariapatienten viel öfter als bei den anderen Kranken, wo sie, wie bekannt, ganz selten vorkommt, beobachtet. (Die Sera waren meist nie mehr als 2 Tage alt.) Trotz der Steigerung der Arbeitsdosis des Komplements haben wir in einer ganzen Reihe der Fälle eine vollständige Hemmung in Kontrollgläsern gehabt. Es ist interessant, daß in diesen Fällen die Sachs-Georgische Reaktion gewöhnlich positiv ausfiel.

Diese Sera (inaktiviert) haben auch bei der physikalisch-chemischen Wirkung (z. B. des Chinins) auf die gewaschenen Blutkörperchen des Menschen wie des Hammels in kleinen Dosen die Hämolysehemmung viel deutlicher als die Kontrollsera hervorgerufen. Hierüber soll später berichtet werden.

Zusammenfassung.

1) Die Sera der Malariakranken geben in großer Prozentzahl positive WaR. — 2) Die WaR. bei Malaria ist zeitlich mit dem Vorhandensein der Parasiten im Blute verbunden und meistens flüchtigen Charakters. — 3) Zur Feststellung der Zeitgrenzen, in welchen die WaR. nach dem Verschwinden der Parasiten in Einzelfällen bestehen bleiben kann, sind weitere Untersuchungen notwendig. — 4) Bei chronischer Malaria ohne Parasiten und da, wo die Malaria nur in der Anamnese vorhanden ist, scheint die positive WaR. gar nicht vorzukommen. Weitere Beobachtungen auf diesem Gebiete sind noch nötig, denn einzelne Ausnahmen, deren Gründe festzustellen wir außerstande waren, können hier auch große praktische Bedeutung haben. — 5) In den endemischen Malariaherden verliert die WaR. ihre praktische Bedeutung für die Syphilisdiagnose nicht, aber hier, und zwar noch mehr, als wo anders, darf man nicht vergessen, daß die serologische Untersuchung ohne allseitige klinische Krankenuntersuchung unvollkommen ist. Die gleichzeitige mikroskopische Untersuchung des dicken Tropfens ist hier in allen Fällen unbedingt zu fordern.

Literatur.

Boehm, Arch. f. Schiffs- u. Tropenkrankh. Bd. 13. 1909. Beih. 6. — Heinemann, ebenda. Bd. 25. 1921. Nr. 3; Bd. 26. 1922. Nr. 12. — Hesse, Münch. med. Woch. 1919. Nr. 35. — Jacobstahl u. Rocha-Lima, Dermat. Woch. Bd. 58. 1914. — Jong et Martin, Presse méd. No. 60. — Meyerstein, Dtsch. med. Woch. 1917. Nr. 11. — Michaelis u. Lesser, Berl. klin. Woch. 1908. Nr. 11. — Mühlens, Die Plasmodien. 1921. — Tuschinsky, Sbornik Trudow po Sypnomu tifu. 1920 [russisch].

Ueber die Konservierung der Luesreagine.

[Aus dem Hygienischen Staatsinstitut zu Hamburg (Direktor: Geheimrat Prof. Dr. R. O. Neumann).]

Von Prof. Dr. **W. Gaehtgens.**

Eine der wichtigsten Vorbedingungen für den einwandfreien Ausfall der WaR. ist bekanntlich die sterile Beschaffenheit der zu untersuchenden Sera. Wohl jede Untersuchungsanstalt wird die Erfahrung gemacht haben, daß ein nicht unbeträchtlicher Teil der eingesandten Blutproben, namentlich nach längerem Transport, sich als keimhaltig erweist und darum, abgesehen von etwaigen Schwierigkeiten bei der ersten Untersuchung, für die spätere Verwendung als Kontrollserum nicht in Frage kommt. Dieser Uebelstand kann sich besonders in kleineren Laboratorien, die nicht mit regelmäßigen, kürzeren Zeitabständen zwischen den einzelnen Untersuchungen rechnen können, unter Umständen sehr unangenehm bemerkbar machen. Aber auch darüber hinaus kann die Frage, ob sich Luessera für längere Zeit reaktionsfähig halten lassen, von Bedeutung werden, wenn aus irgend welchen Gründen ein bestimmtes Serum für spätere Versuche aufgehoben werden soll oder wenn das Serum erst längere Zeit nach der Blutentnahme untersucht werden kann.

Da eine Aenderung der Reaktionsfähigkeit der Luessera meist die Folge einer Mikrobentätigkeit ist, kommt von vornherein als einzige Möglichkeit, die Proben für längere Zeit unverändert zu halten, die Anwendung von Konservierungsmethoden in Betracht, die geeignet sind, die Vermehrung der Bakterien zu verhindern. Die Konservierung kann entweder in dem Zusatz bakterientötender Mittel bestehen oder in der Anwendung von Verfahren, die eine Weiterentwicklung etwaiger Keime zur Unmöglichkeit machen.

Ueber die Konservierung der Luessera durch Zusatz von Desinfizientien liegen schon Untersuchungen von verschiedenen Seiten vor. Wie Bitter (1) berichtet, hat Ruediger bereits 1916 empfohlen, die Wassermann-Sera durch Vermischung mit gleichen Glyzerinmengen zu konservieren. Die Glyzerinierung wird auch von Mc Glumphy (2) und Horowitz-Wlassowa (3) angewandt. Letztere hat das Verfahren ferner bei Tuberkuloseseren benutzt und festgestellt, daß sich die Ambozeptoren bis zu 4 Wochen unverändert halten, daß aber die bald auftretenden Eigenhemmungen ein besonderes Austitrieren der komplementbindenden Serumwirkung notwendig machen. Reichert (4) hat sowohl die Sera als auch die frisch entnommenen Blutproben mit Trypaflavin konserviert und nachgewiesen, daß sich derartige Trypaflavinproben in den ersten 14 Tagen unverändert halten. Vom Anfang der 3. Woche ab machen sich indes unerwünschte Aenderungen bemerkbar, indem manche positiven Sera schwächer positiv, andere wieder eigenhemmend wirken. Auch Phenol ist für die Konservierung in Anwendung gebracht worden, hat sich aber, wie Lange (5) berichtet, wegen der Vermehrung der H-Ionenkonzentration als ungeeignet erwiesen. Will man auf den Zusatz antibakterieller Mittel ganz verzichten, so kommt vor allem die Eintrocknung der Sera in Betracht. Lange hat sich die Papiertrocknung wenig bewährt, während Hartley, Eagleton und Okell (6) angeben, daß eingetrocknete Wassermann-positive Sera sich sehr gut halten.

Wie diese Angaben erkennen lassen, ist die Konservierung der Luesreagine bisher verhältnismäßig wenig bearbeitet worden. Außerdem ist, soweit ich der Literatur entnehmen kann, Reichert bis-

her der einzige gewesen, der genauere Einzelheiten über die Dauer der Konservierbarkeit mitgeteilt hat. So lag es nahe, sowohl die Wirksamkeit der verschiedenen Konservierungsmethoden als auch die Lebensdauer der Luesreagine in konservierten Seren einer eingehenderen Prüfung zu unterziehen.

Zunächst suchte ich, unterstützt von der technischen Hilfsarbeiterin Frl. Scheerer, in orientierenden Untersuchungen festzustellen, welche von den bekannteren Konservierungsmitteln für den vorliegenden Zweck in Frage kommen könnten. Außer Glyzerin und Trypaflavin wurden Chloroform und Kupfer geprüft; eine Reihe von Proben wurde außerdem im Reagenzglase eingetrocknet. Von der Verwendung von Karbol wurde wegen seiner eiweißfällenden Wirkung Abstand genommen. Das Glyzerin wurde zu gleichen Teilen mit dem Serum vermischt. Trypaflavin wurde nach dem Vorschlage Reicherts in der Verdünnung 1:15000 verwandt (1 Tropfen Trypaflavinlösung 1:750 auf 1 ccm Serum). Von Chloroform wurden 2—4 Tropfen mit 1 ccm Serum vermischt. Kupfer wurde nach dem Vorgange Begers (7) in Form eines Stückchens Kupferblech von 1 qcm Größe in 1 ccm Serum gebracht. Alle Röhrchen wurden mit Paraffinverschluß versehen und bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Die Mehrzahl der Proben wurde nach 4—8 Wochen, einige aber auch erst nach 6—8 Monaten nach Wassermann untersucht. Die WaR. wurde mit 3 Extrakten in der üblichen Weise nach der Originalvorschrift ausgeführt; ein Extrakt wurde außerdem unter Verwendung geringerer Komplementmengen, die etwa dem 2—3fachen der jeweiligen Komplementtiterdosis entsprachen, gegen das Serum geprüft. Zur Bindung wurden die Gemische aus Serum, Extrakt und Komplement zuerst $^1/_2$ Std. im Eisschrank und dann $^1/_2$ Std. im Wasserbade gehalten. Nach Zusatz des hämolytischen Systemes wurden die Proben für $^1/_2$ Std. ins Wasserbad gebracht und das Ergebnis hierauf abgelesen.

Das Gesamtergebnis dieser orientierenden Untersuchungen war, kurz zusammengefaßt, recht wenig befriedigend. Vor allem traten sehr bald in vielen Seren störende Eigenhemmungen auf, wie sie schon von verschiedenen Seiten sowohl bei unbehandelten als auch bei konservierten Proben beobachtet worden sind. Am stärksten machten sich die Eigenhemmungen beim Kupfer bemerkbar, während sie sich bei den Glyzerin- und Chloroformproben weniger häufig und in schwächerem Grade feststellen ließen. Andererseits aber traten bei den beiden letztgenannten Mitteln gelegentlich und öfter noch beim Trypaflavin Aenderungen in dem Sinne auf, daß positive Sera, zumal nach längerer Aufbewahrung, nur noch schwach reagierten oder gänzlich negativ wurden. Bei den eingetrockneten Proben blieben Eigenhemmungen zwar aus, einige positive Sera reagierten aber bei der zweiten Untersuchung negativ. Da dieser Verlust der Reaktionsfähigkeit sich indes auf wenige Sera beschränkte, die sich überdies schon bei der ersten Untersuchung als nur schwach positiv erwiesen hatten, erschien der Versuch nicht aussichtslos, durch Antrocknung des Serums an geeignetere Stoffe eine längere Haltbarkeit zu erzielen.

Die Konservierung wurde zu diesem Zwecke in der Weise durchgeführt, daß in der Regel 1 ccm Serum auf den betreffenden Stoff aufgetropft und im Faust-Heimschen Apparat eingetrocknet wurde. Da sich in der Folge nicht alle Stoffe als gleichwertig erwiesen, wurden nacheinander gebleichtes und ungebleichtes Leinen, Baumwolle, Seide

(vorwiegend als Rohseide), ferner Filtrierpapier von Schleicher & Schüll Nr. 602, Kieselsäurefiltrierpapier von der Firma Macherey, Nagel & Co. in Düren Nr. 660, Asbestwolle, Quarzsand und Quarzglas durchgeprüft. Die angetrockneten Proben wurden in Petri-Schalen bei 37° C aufbewahrt und nach Zeitabständen von 2 Wochen bis zu 5 Monaten nach Wassermann untersucht. Zur Lösung des eingetrockneten Serums wurde die Probe, um gleich die für die WaR. übliche 5fache Verdünnung zu erhalten, in 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung gebracht und 4 Std. bei Zimmertemperatur oder bei 37° C gehalten. Diese Behandlung erwies sich unter verschiedenartig gewählten Versuchsanordnungen als die geeignetste. Da die bei 37° C gelösten Proben in Einzelfällen etwas günstigere Resultate ergaben, wurde diese Temperatur in der Regel bevorzugt. Die Ausführung der WaR. erfolgte in der bereits geschilderten Weise. Da sich die Versuche über eine lange Zeitspanne hinzogen, ließ es sich leider nicht vermeiden, daß für die späteren Untersuchungen nicht immer dieselben Extrakte wie bei der ersten benutzt werden konnten. Dieser Umstand dürfte indes auf die Ergebnisse keinen nennenswerten Einfluß ausgeübt haben, da immer nur genau eingestellte, gleichwertige Extrakte zur Anwendung kamen. Da die Wiedergabe der Einzelresultate zu viel Raum beanspruchen würde, sind nur die Endergebnisse in Tabelle I zusammengestellt worden (Tab. I).

Tabelle I.

Angetrocknet an:	Es reagierten bei der Untersuchung:						Gesamtzahl der untersuchten Sera
	I	II	I	II	I	II	
	+−+++	+−+++	±	±	−	−	
I. Leinen (gebleicht)	114	48 = 42 Proz.	12	28	41	91	167
II. „ (ungebleicht)	17	11 = 65 „	—	6	6	6	23
III. Baumwolle	29	16 = 55 „	4	12	13	18	46
IV. Seide	28	18 = 65 „	6	16	15	15	49
V. Filtrierpapier (Schleicher-Schüll)	17	2 = 12 „	—	2	13	26	30
VI. Kieselsäurefiltrierpapier	58	17 = 29 „	3	33	54	65	115
VII. Asbestwolle	24	4 = 16 „	—	—	30	50	54
VIII. Quarzsand und -glas	11	2 = 18 „	—	1	4	12	15

Tabelle I bringt zunächst die Gesamtergebnisse ohne Berücksichtigung der Zeitabstände, die zwischen der 1. und 2. Untersuchung lagen. Als positiv (+−+++) sind der besseren Uebersicht wegen die stark bis schwach positiven Proben zusammengefaßt worden. Als nicht ganz negativ (±) wurden alle Sera bezeichnet, die entweder nur mit dem austitrierten Komplement mehr oder weniger stark positiv reagierten oder gleichzeitig nach der Originalmethode eine angedeutete Reaktion ergeben hatten.

Beim Vergleich der einzelnen Zahlen läßt sich zunächst feststellen, daß der Prozentsatz der positiven Befunde (+−+++) bei der 2. Untersuchung für ungebleichtes Leinen, Baumwolle und Seide annähernd der gleiche ist. Nur gebleichtes Leinen bleibt mit 42 Proz. positiver Reaktionen anscheinend nicht unerheblich hinter den übrigen Stoffen zurück. Doch möchte ich aus dieser Zahl nicht ohne weiteres

auf eine ausgesprochene Ueberlegenheit der letzteren schließen, da wesentlich mehr Proben von gebleichtem Leinen zur Untersuchung kamen, und sich möglicherweise bei Prüfung größerer Mengen der anderen Stoffe die erwähnten Unterschiede mehr ausgeglichen hätten. Im ganzen ergibt sich, daß Sera, die durch Eintrocknung auf einem der genannten Stoffe konserviert sind, ihre Reaktionsfähigkeit nach einer Aufbewahrung von 2 Wochen bis zu 5 Monaten in nahezu $^2/_3$ der Fälle beibehalten.

Demgegenüber eignen sich die übrigen untersuchten Mittel entschieden weniger gut zur Konservierung der Luessera. Besonders stark ausgesprochen ist der Verlust der Reaktionsfähigkeit bei der Verwendung von Filtrierpapier von Schleicher & Schüll. Aber auch Asbestwolle und Quarzsand — Quarzglas wurde nur wenig benutzt — geben wenig bessere Resultate und nur das Kieselsäurefiltrierpapier vermag in etwas weniger als einem Drittel der Fälle die Luesreagine unverändert zu konservieren.

Von geringerem Interesse sind die nicht ganz negativen und negativen Reaktionen, deren Zahl bei der zweiten Untersuchung naturgemäß um so mehr zugenommen hatte, je größer der Verlust an positiv reagierenden Proben war. Für die nicht ganz negativen Resultate ist außerdem zu berücksichtigen, daß eine allerdings beschränkte Zahl von ursprünglich negativen Seren nach längerer Aufbewahrung eine mehr oder minder ausgesprochene Neigung zur Eigenhemmung zeigte, die in einer geringen Hemmung der Hämolyse beim Hauptversuch zum Ausdruck kam. Diese Umstimmung zeitigte bei 2 Seide-, 3 Asbestwolle- und 2 Kieselsäurefiltrierpapierproben, die in der Kontrolle einwandfrei lösten, sogar deutlich positive Reaktionen. Wegen starker, auch in der Kontrolle nachweisbarer Eigenhemmung mußten schließlich 4 Leinen-, 2 Baumwolle-, 2 Seide- und 4 Asbestwollesera von der Beurteilung überhaupt ausgeschlossen werden.

Die genannten Zahlen vermögen indes kein ganz genaues Bild von der Leistungsfähigkeit der untersuchten Stoffe zu geben, vor allem, weil sie die Dauer der Konservierung unbeachtet lassen. Ich habe deshalb in der Tabelle II die Untersuchungsergebnisse der ursprünglich

Tabelle II.

Konserviert mit:	Es reagierten positiv (+—+++) bei der 2. Untersuchung nach:					Gesamt
	2–3 Woch.	3–4 Woch.	1–2 Mon.	2–3 Mon.	3–5 Mon.	
I. Leinen (gebleicht)	17 von 21 = 81 Proz.	3 von 6 = 50 Proz.	19 von 65 = 30 Proz.	7 von 22 = 34 Proz.	—	46 von 114 = 40 Proz.
II. „ (ungebleicht)	4 von 7 = 57 Proz.	4 von 7 = 57 Proz.	2 von 2 = 100 Proz.	—	1 von 1 = 100 Proz.	11 von 17 = 65 Proz.
III. Baumwolle	8 von 13 = 62 Proz.	4 von 7 = 57 Proz.	4 von 6 = 66 Proz.	—	0 von 3 = 0 Proz.	16 von 29 = 55 Proz.
IV. Seide	9 von 13 = 69 Proz.	3 von 8 = 38 Proz.	3 von 4 = 75 Proz.	—	1 von 3 = 33 Proz.	16 von 28 = 57 Proz.
V. Filtrierpapier (Schleicher-Schüll)	0 von 3 = = 0 Proz.	—	—	2 von 9 = 22 Proz.	0 von 5 = 0 Proz.	2 von 17 = 12 Proz.
VI. Kieselsäurefiltrierpapier	1 von 3 = 33 Proz.	—	7 von 16 = 44 Proz.	6 von 27 = 22 Proz.	1 von 12 = 8 Proz.	15 von 58 = 26 Proz.
VII. Asbestwolle	4 von 23 = 17 Proz.	0 von 1 = 0 Proz.	—	—	—	4 von 24 = 17 Proz.
VIII. Quarz	2 von 11 = 18 Proz.	—	—	—	—	2 von 11 = 18 Proz.

positiven Sera — und auf diese kommt es ja vornehmlich an — unter Berücksichtigung der Konservierungsdauer nochmals geordnet.

Wie aus Tabelle II hervorgeht, erfährt die Beurteilung der meisten Stoffe bei dieser Anordnung keine wesentliche Aenderung. Daß einzelne Zahlen aus dem Rahmen des Ganzen herausfallen und nicht immer das zu erwartende regelmäßige Absinken der Kurve zeigen, ist vor allem wohl auf die relativ geringe Menge der Einzelproben zurückzuführen, die auf die verschiedenen Zeitabschnitte entfallen. Im ganzen ergibt sich, daß ungebleichtes Leinen, Baumwolle und Seide ziemlich gleichmäßig die Luesreagine bis zu 2 Monaten in nahezu $^2/_3$ der Fälle zu konservieren vermögen. Die nach 3—5 Monaten erhaltenen Befunde sind zu gering an Zahl, um auf Beweiskraft Anspruch erheben zu können. Gebleichtes Leinen zeigt insofern ein von den eben genannten Stoffen abweichendes Verhalten, als die Haltbarkeit der Luesreagine entsprechend der Konservierungsdauer allmählich und gleichmäßig abnimmt. Während nach 2—3 Wochen noch 81 Proz. der Sera ihre Reaktionsfähigkeit behalten hatten, reagierten nach 3—4 Wochen nur noch 50 Proz. positiv und nach 1—2 bzw. 2—3 Monaten war der prozentuale Anteil weiter auf 30 Proz. bzw. 34 Proz. gesunken. Die an Filtrierpapier, Asbestwolle oder Quarzsand angetrockneten Sera wiesen demgegenüber von vornherein eine außerordentlich geringe Haltbarkeit auf. Die Zahl der mit diesen Mitteln konservierten Proben ist zwar klein, die Ergebnisse der 2. Untersuchung erschienen aber so wenig aussichtsreich, daß von der Bearbeitung weiterer Sera Abstand genommen wurde.

Ueberblickt man die bisherigen Ergebnisse von dem Standpunkte aus, ob sich einer der untersuchten Stoffe für die längere, sichere Konservierung der Luesreagine eigne, so muß diese Frage verneint werden. Vor allem sind die beiden Filtrierpapierarten, Asbestwolle und Quarzsand nicht imstande, die Haltbarkeit auch nur für eine kürzere Zeit von 2—3 Wochen einigermaßen zu gewährleisten. Meine Beobachtungen bestätigen also durchaus die Angaben Langes, dem sich die Papiertrocknung ebenfalls wenig bewährt hat. Günstiger sind in dieser Hinsicht ungebleichtes Leinen, Baumwolle und Seide zu beurteilen, welche in nahezu $^2/_3$ der Fälle die Luesreagine bis zu 2 Monaten zu konservieren imstande sind. Gebleichtes Leinen ist nur dann als geeignet zu bezeichnen, wenn eine kürzere Haltbarmachung bis zu drei Wochen Dauer in Frage kommt; über diesen Zeitpunkt hinaus bleibt es aber in seiner Leistungsfähigkeit hinter den anderen Stoffen erheblich zurück. Sieht man sich also in der Praxis in die Zwangslage versetzt, ein Luesserum für längere Zeit haltbar zu machen, so könnte man in Ermangelung anderer Mittel einen der zuletzt genannten Stoffe zur Konservierung benutzen, müßte dabei aber berücksichtigen, daß auf diese Weise mindestens $^1/_3$ der Fälle der serologischen Feststellung entgehen würde.

Die Eintrocknung der Sera zum Zwecke der Konservierung vermag also trotz mancher Vorzüge, welche gerade diesem Verfahren für längere Transporte usw. zukommen würden, keineswegs als Idealmethode bezeichnet zu werden. Ich wandte mich deshalb wieder den oben erwähnten Desinfektionsmitteln zu und versuchte, die bei ihnen allmählich aufgetretenen störenden Eigenschaften zu beseitigen oder doch wenigstens abzuschwächen. Von der nochmaligen Verwendung des Kupfers nahm

ich indes Abstand, weil sämtliche Kupferproben durch besonders starke Eigenhemmungen ausgezeichnet waren. Ebenso wurde auf die Konservierung mit Trypaflavin verzichtet, da die Trypaflavinproben bei längerer Aufbewahrung ihre positive Reaktionsfähigkeit recht häufig eingebüßt hatten. Aussichtsvoller schien mir die Verwendung von Glyzerin und Chloroform, welche die Luesreagine bei den meisten Proben recht gut konserviert und nur bei vereinzelten Seren das Auftreten einer meist mäßigen Eigenhemmung veranlaßt hatten.

Die genauere Untersuchung einiger mit Glyzerin oder Chloroform konservierten, eigenhemmenden Proben ergab, daß die nach längerer Aufbewahrung nachweisbare Eigenhemmung durch Thermolabilität ausgezeichnet ist. Wurden derartige Sera in ein Wasserbad von 55° C gebracht, so ließ sich der Hemmungskörper meist schon nach kurzer Zeit nicht mehr feststellen. In Tabelle III habe ich zur Veranschaulichung dieser Beobachtung einige Versuchsbeispiele zusammengestellt (Tab. III).

Tabelle III.

Serum Nr.	I. Untersuchung (WaR.)	Serum + Glyzerin (āā) gemischt am	II. Untersuchung (WaR.): Datum	nicht erhitzt	Erhitzt auf 55° C: 5 Min.	10 Min.	15 Min.
8859	—	15. 11. 1924	17. 3. 1925	+++	—	—	—
8878	+	15. 11. 1924	17. 3. 1925	+++	+	—	—
9530	+++	6. 12. 1924	13. 3. 1925	+++	+	±	—
9535	++	6. 12. 1924	13. 3. 1925	+++	±	±	—

Wie aus dieser Zusammenstellung hervorgeht, treten Eigenhemmungen nach längerer Aufbewahrung sowohl bei negativen als auch bei stark und schwach positiven Glyzerinseren auf. Werden derartige Sera auf 55° C erhitzt, so verschwinden die Hemmungskörper oft schon nach 5 Min., in der Regel aber nach einer Viertelstunde. Nur in seltenen Fällen widerstehen sie einer so langen Erhitzung; unter 151 Glyzerinproben mußten nur 6 wegen starker Eigenhemmung von der Untersuchung ausgeschlossen werden, von diesen müssen aber zwei ausscheiden, da sie in der alten Weise vor dem Versuch nicht erhitzt worden waren.

In der Regel wird es also gelingen, durch Erhitzung den Hemmungskörper in Glyzerinseren so weit auszuschalten, daß in den Kontrollen eine Hemmung der Hämolyse nicht mehr nachweisbar ist. Im Hauptversuch macht sich allerdings bei derartigen Proben zuweilen noch eine erhöhte Reaktionsfähigkeit geltend, von der sich nicht ohne weiteres entscheiden läßt, wieweit sie etwa auf einen Rest von Eigenhemmung oder auf die verstärkende Wirkung des Glyzerins zurückgeführt werden muß. Namentlich tritt dieser Einfluß gegenüber geringeren Komplementmengen zutage. Von 59 negativen Glyzerinseren, die in der Kontrolle keine Eigenhemmung zeigten, gaben im Hauptversuch im ganzen 14 einen mehr oder weniger stark positiven Ausschlag. Die Originalmethode hatte bei 5 Proben, die von 3 Patienten stammten, ein positives Resultat. Der eine Fall, der ursprünglich negativ reagiert hatte, betraf eine behandelte Lues latens. Das mit Glyzerin konservierte Serum dieses Kranken ergab nach $3^1/_2$ Wochen eine schwach positive (+), nach $4^1/_2$ Wochen und $4^1/_2$ Monaten eine deutlich positive (++) WaR.

bei einwandfreier Kontrolle. Ob in diesem Falle das negative Ergebnis der 1. Untersuchung eine Fehldiagnose war und erst die allmählich zunehmende Glyzerinwirkung die richtige Beurteilung ermöglichte oder umgekehrt, mußte unentschieden bleiben. Die beiden anderen Fälle (1 Ulcus cruris, 1 Luesverdacht) müssen dagegen als Versager infolge einer durch das Glyzerin verstärkten, in der Kontrolle aber nicht nachweisbaren Eigenhemmung bezeichnet werden. Der Ulcuspatient hatte bei der 2. Untersuchung eine schwach positive (+), der Verdachtsfall nur eine nicht ganz negative (±) WaR.

Die übrigen 9 Proben hatten nur mit der verringerten Komplementmenge eine Bindung ergeben, und zwar war die Reaktion nur einmal deutlich ausgesprochen (++), einmal dagegen schwach positiv (+) und 7mal nicht ganz negativ (±). 2 von diesen Seren stammten von sicheren Luesfällen, die übrigen von andersartigen Erkrankungen oder luesverdächtigen Patienten. Im ganzen also kommt der durch Glyzerin verstärkten Eigenhemmung, die sich noch nach der Erhitzung bemerkbar macht, nur eine geringe Bedeutung zu. Die durch sie bedingten positiven Reaktionen sind in der Regel nur so schwach ausgesprochen, daß sie ohnehin nicht die Abgabe einer positiven Diagnose, zumal unter Berücksichtigung des klinischen Befundes, rechtfertigen würden.

Es liegt nahe, diese verstärkende Wirkung des Glyzerins für die WaR. auszunutzen, namentlich bei solchen Proben, deren Reaktionsfähigkeit mehr oder weniger abgeschwächt ist. In der Tat gelang es mir, bei einigen an Leinen angetrockneten positiven Seren, die in einer Glyzerinkochsalzlösung (1 Glyzerin: 5 Kochsalzlösung) aufgelöst waren, die Hemmung der Hämolyse deutlicher zum Ausdruck zu bringen, während die mit reiner Kochsalzlösung behandelten Proben schwächer reagierten. Die Unterschiede waren aber nur gering und traten nur in seltenen Fällen auf, so daß ich von der Weiterführung dieser Versuche Abstand nahm. Immerhin beweisen diese Beobachtungen, daß in Glyzerinseren neben der gewöhnlichen Eigenhemmung, wie sie auch in unbehandelten Proben auftritt, noch die komplementbindende Glyzerinwirkung für die Entstehung der Störung von Bedeutung ist.

Ganz ähnlich wie die Glyzerinproben verhalten sich die mit Chloroform konservierten Sera. Auch hier treten die Eigenhemmungen keineswegs regelmäßig oder nach bestimmten Zeiten auf. Bei manchen Proben macht sich die Störung schon nach wenigen Wochen, bei anderen wieder erst nach Monaten bemerkbar. Durch Erhitzung auf 55° C wird die Hemmung in der Regel spätestens nach 15 Min. beseitigt. Von 133 erhitzten Chloroformseren mußten nur 2 wegen starker Eigenhemmung von der Besprechung ausgeschieden werden. Auch manche ursprünglich negativen Chloroformproben geben bei einwandfreier Beschaffenheit der Kontrolle eine Komplementbindung. Unter 53 Seren fanden sich 11, die in dieser Weise reagierten. Bemerkenswerterweise trat die Hemmung aber niemals bei der Originalmethode auf, sondern nur bei Verwendung austitrierter Komplementmengen, und zwar 2mal stark ausgesprochen (+++), 3mal deutlich (++), 5mal schwach (+) und einmal nur angedeutet (±). Bei 2 von diesen Fällen lag sichere Lues vor, bei den übrigen nur Luesverdacht oder eine andere Erkrankung. Auch hier also würde der schwache Ausfall der serologischen Reaktion in Verbin-

dung mit dem klinischen Befunde ohnehin zur Vorsicht mahnen und jedenfalls die Abgabe einer glatt positiven Diagnose nicht berechtigt erscheinen lassen.

Die mit Glyzerin und Chloroform versetzten Sera wurden nach verschiedenen Zeiten in der anfangs geschilderten Weise untersucht, nachdem sie, von wenigen Ausnahmen abgesehen, eine Viertelstunde auf 55° C erhitzt worden waren. Tabelle IV gibt zunächst eine Gesamtübersicht der Ergebnisse.

Tabelle IV.

Konserviert mit:	Es reagierten bei der Untersuchung:						Gesamtzahl der untersuchten Sera
	I	II	I	II	I	II	
	+—+++	+—+++	±	±	—	—	
I. Glyzerin	76	72 = 95 Proz.	10	25	59	48	145
II. Chloroform	70	52 = 74 „	8	26	53	53	131

Wie aus dieser Zusammenstellung hervorgeht, vermochte die Glyzerinkonservierung die Luesreagine bei 95 Proz. der untersuchten positiven Proben anscheinend unverändert zu erhalten; sie übertrifft in ihrer Leistungsfähigkeit die Eintrocknungsverfahren also ganz erheblich. Auch dem Chloroform ist sie entschieden überlegen, da dieses nur 74 Proz. der positiven Sera konserviert hatte. Eine einwandfreie Beurteilung des Wertes beider Mittel wird durch die vorstehende Uebersicht indes nicht ermöglicht, da, wie bereits erörtert, einige ursprünglich negative Proben bei der Nachuntersuchung positiv reagierten, andere wieder eine Abschwächung ihrer anfänglichen Reaktionsfähigkeit erfahren hatten. Ich habe deshalb in der Tabelle V für die ursprünglich positiven Sera die Ergebnisse der Nachuntersuchung nach Zeitabschnitten geordnet zusammengefaßt.

Tabelle V.

Konserviert mit:	Es reagierten positiv (+—+++) bei der 2. Untersuchung nach:					Gesamt
	2—3 Woch.	3—4 Woch.	1—2 Mon.	2—3 Mon.	3—5 Mon.	
I. Glyzerin	11 von 11 = 100 Proz.	9 von 9 = 100 Proz.	25 von 32 = 80 Proz.	8 von 13 = 62 Proz.	10 von 11 = 91 Proz.	63 von 76 = 83 Proz.
II. Chloroform	9 von 9 = 100 Proz.	9 von 9 = 100 Proz.	16 von 31 = 52 Proz.	4 von 10 = 40 Proz.	11 von 11 = 100 Proz.	49 von 70 = 70 Proz.

Diese Anordnung läßt die Glyzerin- und Chloroformkonservierung, sofern man nur die Gesamtzahlen betrachtet, in einem etwas weniger günstigen Lichte erscheinen. Das Glyzerin hat im ganzen bei 83 Proz. der untersuchten Proben die Reaktionsfähigkeit zu erhalten vermocht, das Chloroform nur bei 70 Proz. Bei Berücksichtigung der Konservierungsdauer ergibt sich indes, daß das Glyzerin in den ersten 4 Wochen die Luesreagine in allen Fällen unverändert, von geringfügigen Abschwächungen abgesehen, erhalten hat. Nach 1—2 Monaten sinkt die Prozentzahl positiver Befunde auf 80 Proz. und nach 2—3 Monaten auf 62 Proz., um nach 3—5 Monaten wieder auf 91 Proz. anzusteigen. Ebenso haben

sich alle Chloroformsera in den ersten 4 Wochen unverändert gehalten. Nach 1—2 Monaten reagieren 52 Proz. und nach 2—3 Monaten nur noch 40 Proz. der Chloroformproben positiv, um nach 3—5 Monaten wieder auf 100 Proz. anzusteigen. Glyzerin und Chloroform haben auffallenderweise beide nach 3—5 Monate langer Einwirkung die Reaktionsfähigkeit der Sera fast ganz bzw. ganz zu erhalten vermocht. Ob es sich bei diesen Ergebnissen um ein gesetzmäßiges Verhalten oder, wie es angesichts der geringen Zahl von Proben wahrscheinlicher sein dürfte, um Zufallsbefunde handelt, könnte nur auf Grund ausgedehnterer Untersuchungen entschieden werden.

Aus den vorliegenden Beobachtungen geht hervor, daß Glyzerin und Chloroform durchaus geeignete Mittel zur Erhaltung der Luesreagine sind, sofern die Konservierungsdauer 4 Wochen nicht überschreitet. Ueber diesen Zeitpunkt hinaus geht ihre Wirkung zurück, und zwar beim Chloroform in stärkerem Maße als beim Glyzerin. Zu diesem Nachteil gesellt sich das bereits erörterte Auftreten von Eigenhemmungen, die sich bei manchen Seren auch durch Erhitzung auf 55° C nicht völlig beseitigen lassen und gelegentlich positive Reaktionen vortäuschen können. Größere Bedeutung kann dieser Erscheinung indes nicht zugemessen werden, da die Reaktionen fast immer nur sehr schwach sind und bei kritischer Bewertung und Berücksichtigung der klinischen Symptome zu Fehldiagnosen kaum Anlaß bieten dürften.

In Ergänzung der vorstehenden Versuche habe ich die meisten auf verschiedene Weise konservierten Sera auch nach Sachs-Georgi untersucht. Der Sera wurden, wie üblich, mit cholesteriniertem Rinderherzextrakt vermischt, im Brutschrank gehalten und sowohl nach 24 als auch nach 48 Std. besichtigt. In Tabelle VI sind, um Raum zu sparen, nur die Resultate zusammengestellt, welche die Nachuntersuchung der ursprünglich nach Sachs-Georgi positiven Sera ergeben hatte. Als positiv sind hier auch solche Sera aufgeführt worden, die erst nach 48 Std. positiv reagiert hatten.

Tabelle VI.

Konserviert mit:	Es reagierten positiv bei der 2. Untersuchung nach:					Gesamt
	2—3 Woch.	3—4 Woch.	1—2 Mon.	2—3 Mon.	3—5 Mon.	
I. Glyzerin	7 von 10 = 70 Proz.	9 von 10 = 90 Proz.	15 von 23 = 65 Proz.	4 von 6 = 66 Proz.	7 von 12 = 58 Proz.	42 von 61 = 70 Proz.
II. Chloroform	6 von 9 = 66 Proz.	6 von 9 = 66 Proz.	17 von 23 = 74 Proz.	5 von 6 = 83 Proz.	9 von 10 = 90 Proz.	43 von 57 = 75 Proz.
III. Leinen (gebleicht)	19 von 22 = 86 Proz.	4 von 8 = 50 Proz.	21 von 43 = 49 Proz.	2 von 20 = 10 Proz.	—	46 von 93 = 49 Proz.
IV. „ (ungebleicht)	2 von 3 = 66 Proz.	1 von 6 = 17 Proz.	1 von 3 = 33 Proz.	—	0 von 1 = 0 Proz.	4 von 13 = 31 Proz.
V. Baumwolle	6 von 12 = 50 Proz.	1 von 6 = 17 Proz.	1 von 6 = 17 Proz.	—	0 von 3 = 0 Proz.	8 von 27 = 30 Proz.
VI. Seide	10 von 15 = 66 Proz.	2 von 8 = 25 Proz.	2 von 4 = 50 Proz.	—	0 von 3 = 0 Proz.	14 von 30 = 47 Proz.
VII. Filtrierpapier (Schleicher-Schüll)	0 von 2 = 0 Proz.	—	—	3 von 7 = 43 Proz.	0 von 5 = 0 Proz.	3 von 14 = 21 Proz.
VIII. Kieselsäurefiltrierpapier	1 von 2 = 50 Proz.	—	9 von 16 = 56 Proz.	3 von 24 = 13 Proz.	2 von 11 = 18 Proz.	15 von 53 = 28 Proz.
IX. Asbestwolle	7 von 23 = 30 Proz.	0 von 1 = 0 Proz.	—	—	—	7 von 24 = 29 Proz.
X. Quarz	3 von 11 = 27 Proz.	—	—	—	—	3 von 11 = 27 Proz.

Der Vollständigkeit halber habe ich in Tab. VI die mit allen geprüften Mitteln erhaltenen Resultate wiedergegeben, wenngleich ich mir bewußt bin, daß bei einigen die relativ geringe Zahl der untersuchten Proben keine bindenden Schlüsse zuläßt. Im großen und ganzen ergibt sich aber doch ein Bild, das mit den Befunden der WaR. eine weitgehende Uebereinstimmung zeigt. Unverkennbar tritt auch hier die Ueberlegenheit des Chloroforms und Glyzerins über die Eintrocknungsverfahren zutage. Die Gesamtleistung von 70 Proz. positiver Ergebnisse beim Glyzerin und von 75 Proz. beim Chloroform stimmt annähernd mit den Erfahrungen, wie sie in Tab. V niedergelegt sind, überein. Die Unterschiede zwischen kürzerer und längerer Konservierungsdauer, die bei der WaR. stark ausgeprägt waren und Glyzerin und Chloroform in den ersten 4 Wochen als vorzügliche Konservierungsmittel erscheinen ließen, fehlen allerdings bei der Sachs-Georgi-Reaktion. Bei den Chloroformproben scheint sich sogar die Reaktionsfähigkeit um so besser zu erhalten, je länger die Aufbewahrung dauert. Trotz der verhältnismäßig geringen Zahl von Untersuchungen läßt sich dieser Befund nicht nur einem Zufall zuschreiben, da die Chloroformsera, zumal die älteren, schon an sich eine erhöhte Neigung zur Ausflockung erkennen ließen. Von 69 in der Tabelle nicht aufgeführten Chloroformproben, die ursprünglich nach Sachs-Georgi negativ reagiert hatten, ergaben bei der Nachuntersuchung nicht weniger als 18 = 26 Proz. eine positive SGR. Unter diesen 18 Seren befanden sich nur 3 mit positiver WaR., bei den übrigen 15 mußte dagegen die Ausfällung als unspezifisch angesprochen werden. Das Chloroform würde demnach auch wegen dieser Störung für die Konservierung weniger geeignet sein als das Glyzerin. Von 79 ursprünglich negativen Glyzerinproben ergab demgegenüber bei der Nachuntersuchung nur 1 eine positive SGR., die durch den positiven Ausfall der WaR. bestätigt wurde.

Die eingehende Erörterung der übrigen, mit den Trockenseren erzielten Ergebnisse erübrigt sich, da die Zahlen untereinander eine recht weitgehende Uebereinstimmung erkennen lassen. In der Gesamtleistung erreichen nur gebleichtes Leinen und Seide die bei der WaR. festgestellten Durchschnittswerte. Dabei ist aber zu berücksichtigen, daß von den Leinenproben ein Drittel und von den Seidenproben sogar zwei Drittel nur eine abgeschwächte Reaktion ergeben hatten, die erst nach 48 Std. erkennbar wurde. Erwähnenswert ist, daß auch bei diesen Versuchen von den an gebleichtes Leinen angetrockneten Seren 86 Proz. in den ersten 3 Wochen ihre Reaktionsfähigkeit behalten hatten. Bei ungebleichtem Leinen, Seide und Baumwolle ist nur nach kürzerer Konservierungsdauer von 2—3 Wochen mit einer erheblicheren Haltbarkeit der Sera zu rechnen. Bei längerer Aufbewahrung sinkt die Leistungsfähigkeit dieser Stoffe in einem Grade, daß sie die Filtrierpapiere, Asbestwolle und Quarz kaum mehr übertreffen.

Für die Konservierung der bei der SGR. wirksamen Serumbestandteile können demnach nur Glyzerin und Chloroform ernsthaft in Frage kommen. Beide Mittel vermögen zwar nicht immer, auch bei kürzerer Konservierungsdauer, die unveränderte Reaktionsfähigkeit der Luessera zu gewährleisten, übertreffen aber die Eintrocknungsverfahren doch um ein Erhebliches. Insbesondere verdient das Glyzerin als recht leistungsfähiges Konser-

vierungsmittel Beachtung, da es dem Chloroform aus verschiedenen bereits erörterten Gründen vorzuziehen ist.

Faßt man die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen zusammen, so muß zunächst hervorgehoben werden, daß eine gesetzmäßige Dauer für die Haltbarkeit der Luesreagine in konservierten Seren nicht hat festgestellt werden können. Es ließ sich nicht entscheiden, warum bei geeigneter Konservierung manche positiven Proben schon nach kurzer Zeit negativ wurden, während die Mehrzahl ihre Reaktionsfähigkeit selbst monatelang ganz oder nahezu unverändert beibehielt. In hohem Maße ist die Haltbarkeit der Luesreagine in konservierten Seren von der Art der Konservierung abhängig. Kein einziges der geprüften Mittel vermag alle Bedingungen zu erfüllen, die an ein Idealverfahren zu stellen sind. Es wäre allerdings auch verfehlt, eine jahrelange Konservierung der Luesreagine anstreben zu wollen. Sehen wir doch, daß auch viel widerstandsfähigere Reaktionskörper, wie die Agglutinine, Präzipitine usw., auf die Dauer nicht unverändert haltbar sind, sondern allmählich, allen Konservierungsarten zum Trotz, abgeschwächt werden. Damit soll natürlich nicht gesagt sein, daß es nicht vielleicht auf andere Art doch noch gelingen könnte, die Luesreagine für längere Zeit, als es mir gelungen ist, sicher zu konservieren. Einwandfrei scheint indes aus meinen Untersuchungen hervorzugehen, daß für die Haltbarmachung der Luessera die Eintrocknungsverfahren wenig geeignet sind. Offenbar treten bei diesem Prozeß tiefergreifende Veränderungen an den Serumglobulinen, den Trägern der wassermannpositiven Funktion, auf. Nur in Ermangelung anderer Mittel würde es sich empfehlen, das Serum an einen geeigneten Stoff, etwa Leinen, Baumwolle oder Seide, anzutrocknen. Bei diesem Vorgehen müßte aber immer berücksichtigt werden, daß die Konservierung mit annähernder Sicherheit nur bei ca. zwei Dritteln der Proben für die Dauer von 2 Monaten gelingt.

Viel sicherer wird die Haltbarkeit der Luesreagine durch den Zusatz von Glyzerin oder Chloroform verbürgt. Beide Mittel haben während der ersten 4 Wochen die Reaktionsfähigkeit aller untersuchten Sera im ganzen unverändert erhalten. Daß gelegentlich geringfügige Abschwächungen der Reaktionsstärke auftreten, darf angesichts der Labilität der Luesreagine nicht wundernehmen. Innerhalb der angegebenen Zeit sind sie jedenfalls nicht so bedeutend, daß eine negative Reaktion vorgetäuscht werden könnte. Erst bei einer Aufbewahrung, die länger als einen Monat dauert, ist mit Fehlresultaten zu rechnen, und zwar beim Chloroform häufiger als beim Glyzerin. Letzteres ist dem Chloroform, das wegen seiner eiweißfällenden Wirkung und Flüchtigkeit ohnehin für die Konservierung weniger in Betracht kommen dürfte, auch insofern überlegen, als die Glyzerinsera, im Gegensatz zu den Chloroformproben, bei der Sachs-Georgi-Reaktion nicht zu unspezifischen Ausfällungen neigen. Dagegen treten sowohl bei Glyzerin- als auch bei Chloroformseren gelegentlich Eigenhemmungen auf, die in der Regel zwar thermolabil sind, in seltenen Fällen aber doch schwach positive Reaktionen vortäuschen können.

Natürlich lag es nahe, die konservierende Wirkung des Glyzerins auch für die Haltbarmachung von Blut auszunutzen. Zu diesem Zwecke wurden die wassermannpositiven Blutproben von 5 Syphilitikern verschiedener Stadien unmittelbar nach der Entnahme mit gleichen Glyzerinmengen vermischt und in luftdicht verschlossenen Röhrchen bei

Zimmertemperatur aufbewahrt. Nach 1 Monat wurden die Proben, die sich inzwischen stark hämolytisch verändert hatten, zentrifugiert, die Sera $^1/_4$ Std. auf 55° C erhitzt und dann in der üblichen Weise nach Wassermann untersucht. In allen 5 Fällen war die Reaktionsfähigkeit erhalten geblieben, und zwar 3mal unverändert, 1mal verstärkt und 1mal etwas abgeschwächt, aber so, daß das positive Ergebnis unzweifelhaft war. Die Sachs-Georgi-Reaktion war 2mal unverändert geblieben, 1mal verstärkt, 1mal positiv und 1mal negativ geworden. Die Ausführung einer zweiten Nachuntersuchung nach 2 Monaten erwies sich als unmöglich wegen sehr starker Eigenhemmung, die auch durch Erhitzung auf 55° C nicht zu beseitigen war. Die Haltbarmachung mit Glyzerin läßt sich also, wie aus diesen orientierenden Untersuchungen hervorgeht, bis zu einer Dauer von 4 Wochen auch bei Blutproben durchführen. Bei längerer Konservierung treten starke Eigenhemmungen auf, die thermostabil sind, sich aber vielleicht nach dem Vorgange von Horowitz-Wlassowa durch Austitrieren oder durch Verwendung höherer Serumverdünnungen überwinden ließen.

Schlußsätze.

1) Die Haltbarkeit der Luesreagine in konservierten Seren ist in hohem Maße von der Art der Konservierung abhängig. Der Zusatz von Desinfektionsmitteln vermag die Sera sicherer und länger unverändert zu halten als die Eintrocknung. — 2) Leinen, Baumwolle und Seide eignen sich zum Antrocknen der Sera besser als Filtrierpapier, Asbestwolle und Quarz, können aber durchschnittlich nur bei zwei Dritteln der Sera die Reaktionsfähigkeit bis zu 2 Monaten unverändert halten. — 3) Glyzerin konserviert die Luesreagine in den ersten 4 Wochen in 100 Proz. der Fälle. Ueber diesen Zeitpunkt hinaus sinkt die Reaktionsfähigkeit der Glyzerinseren allmählich ab. — 4) Chloroform ist dem Glyzerin nahezu gleichwertig. In den ersten 4 Wochen bleiben ebenfalls 100 Proz. der positiven Sera unverändert, bei längerer Aufbewahrung geht aber die Reaktionsfähigkeit stärker zurück als bei Glyzerinproben. — 5) In manchen Glyzerin- und Chloroformseren treten nach längerer Aufbewahrung Eigenhemmungen auf, die in der Regel durch Thermolabilität ausgezeichnet sind. Gelegentlich macht sich diese Eigenhemmung aber auch nach der Erhitzung noch durch eine erhöhte Reaktionsfähigkeit bei der WaR. bemerkbar. — 6) Auch bei der Sachs-Georgi-Reaktion ist die Glyzerin- und Chloroformkonservierung den Eintrocknungsverfahren deutlich überlegen, wenngleich ihre Wirksamkeit etwas schwächer als bei der WaR. zu sein scheint. — 7) Chloroformsera zeigen, zumal nach längerer Aufbewahrung, bei der SGR. häufiger Neigung zu unspezifischen Ausfällungen. — 8) Von den geprüften Mitteln eignet sich demnach das Glyzerin am meisten für die längere Konservierung der Luesreagine.

Literatur.

1) Bitter, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 87. 1922. S. 560. — 2) McGlumphy, Ref. Centralbl. f. d. ges. Hyg. Bd. 9. 1924. S. 359. —

3) Horowitz-Wlassowa, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 94. 1925. S. 123, und Zeitschr. f. Immunitätsforsch. Bd. 42. 1925. S. 1. — 4) Reichert, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 88. 1922. S. 593. — 5) Lange, Ztschr. f. Immunitätsf. Bd. 26. 1917. S. 396. — 6) Hartley, Eagleton u. Okell, Ref. Centralbl. f. d. ges. Hyg. Bd. 4. 1923. S. 247. — 7) Beger, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 89. 1922. S. 210.

Inaktivierte konservierte antirabische Vakzine „58—60“.

Vorläufige Mitteilung[1]).

[Aus dem Swerdlowsker Bakteriologischen Institut (Direktor: Prof. Dr. I. I. Stepanow-Grigorjew) und aus dem Poltawaer Pasteurinstitut (ehem. Chef Dr. O. Herrmann).]

Von Dr. **Otto Herrmann,**

Leiter der Pasteur- und Malariaabteilungen im Swerdlowsker Bakteriol. Institut.

In meinen Arbeiten „Immunisation gegen Tollwut mit verschiedenen Vakzinen“[2]) und „Anaphylaxie bei antirabischen und etlichen anderen Impfungen“[3]) habe ich schon gezeigt, daß bei der Prüfung verschiedener Vakzinen, unter anderen auch der üblichen ex tempore hergestellten Rückenmarkaufschwemmung, die besten Resultate, was Immunisationsvermögen betreffs Lyssa und minimale Anaphylaxie anbetrifft, die Vakzine gibt, welche aus dem Gehirn und Rückenmark des mit Virus fixe infizierten Kaninchens in Kochsalzlösung auf die Dauer hergestellt, während 30 Minuten auf 58—60° C erwärmt wird, und zu welcher ich danach $^1/_2$proz. Ac. carbol. liquef. hinzufüge.

In der Schlußfolgerung der ersteren Arbeit wird erwähnt, daß eine 16tägige Immunisation nicht immer genügt und daß weit bessere Resultate durch Impfungen während 24—30 Tagen zu erlangen sind. Beinahe alle Versuchstiere, welche mit $^1/_2$proz. oder 1proz. Vakzine „58—60“ ungefähr 24 Tage geimpft und danach intrazerebral mit sehr virulentem Straßenvirus infiziert wurden, blieben am Leben.

Weiterhin bemühte ich mich, ausfindig zu machen, welche Konzentration der Vakzine am besten wirkt, wie lange diese konservierte Vakzine das Immunisationsvermögen beibehält und ob es besser ist, jeden Tag oder mit Intervallen zu impfen.

Meine Arbeit ist bei weitem noch nicht abgeschlossen, jedoch kann ein Teil derselben schon jetzt in folgenden Tabellen schematisiert werden:

Aus der Tabelle I ersehen wir, daß beim Gebrauche von 1proz. konservierter Vakzine „58—60“ im Alter von 69—98 Tagen Injektionen 1—12 Tage hintereinander 1mal täglich und 7malige Injektionen mit 4tägigen Intervallen nicht genügten, um gegen eine darauf folgende

---

1) Umgearbeitet nach in Charkow am 16. 3. 1925 während der Allukrain. Beratung der Direktoren der Bakteriologischen Institute und in Swerdlowsk (Jekaterinburg) am 27. 4. 1925 im Uralsker Med. Wissenschaftl. Verein gehaltenen Vorträgen.

2) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 94. 1925.

3) Ebenda.

intrazerebrale Infektion mit Straßenvirus zu schützen. Nur nach 8maliger Injektion mit 4tägiger Zwischenzeit überlebte ein Kaninchen eine intrazerebrale Infektion. Als es aber nach $4^1/_2$ Monaten i.cer. mit Straßen-

Tabelle I.

Tier	Immunisiert subkutan: Womit	Alter der Vakzine in Tagen	Zu wieviel Kubikzentimeter	Wieviel Tage	Nach wieviel Tagen	Gehirn in Gramm	Infiziert i.cer. mit Straßenvirus: Nach wieviel Tagen	Wann	Erkrankt nach wieviel Tagen	Tod nach wieviel Tagen	Todesursache	Bemerkungen
Kan.												
176	1proz. Vakzine „58—60", am 10. 6. 24 hergestellt	76	2	1	—	0,02	8	2. 9. 24	13	15	Lyssa	.
177		76	2	1	—	0,02	8	2. 9. 24	16	18	„	.
175		76—77	2	2	tägl.	0,04	13	8. 11. 24	13	15	„	.
174		76—77	2	2	„	0,04	13	8. 11. 24	43	45	„	.
178		69—74	2	2	nach 4 Tg.	0,04	10	2. 11. 24	15	16	„	.
173		76—78	2	3	tägl.	0,06	12	8. 11. 24	77	80	„	.
179		69—78	2	3	nach 4 Tg.	0,06	12	8. 11. 24	10	13	„	.
180		69—82	2	4	dgl.	0,08	8	8. 11. 24	14	19	„	.
172		69—73	2	5	tägl.	0,1	10	2. 11. 24	15	19	„	.
181		69—94	2	7	nach 4 Tg.	0,14	10	22. 11. 24	18	20	„	.
171		69—76	2	8	tägl.	0,16	13	8. 11. 24	11	12	„	.
182		69—98	2	8	nach 4 Tg.	0,16	16	2. 10. 24	—	—	blieb gesund	Nach $4^1/_2$ Mon. (am 27. 2. 25) zum 2. Mal i.zer. infiziert mit Straßenvirus. Tod an Lyssa 19. 3. 25.
170		69—80	2	12	tägl.	0,24	9	8. 11. 24	13	14	Lyssa	.
169		69—86	2	18	„	0,36	27	2. 10. 24	—	—	lebt	Nach $4^1/_2$ Mon. (am 27. 2. 25) zum 2. Mal i.zer. infiziert mit Straßenvirus. Lebt.
168		69—92	2	24	„	0,48	11	22. 11. 24	—	—	„	Nach 2 Mon. 7 Tg. (am 29.1.25) zum 2. Mal infiziert mit Straßenvirus. Lebt.
183	Kontrolle	—	—	—	—	—	—	22. 8. 24	12	14	Lyssa	.
184	„	—	—	—	—	—	—	2. 9. 24	12	14	„	.

virus inokuliert wurde, erlag es der Wut nach 20 Tagen. Nach 18- und 24tägiger Immunisation dagegen blieben die Kaninchen auch nach der 2. intrazerebralen Infektion mit sehr virulentem Straßenvirus am Leben.

Um das Immunisationsvermögen sehr konzentrierter Vakzine zu prüfen, habe ich (s. Tab. II) 6 Kaninchen eine 10proz. Vakzine „58—60" (13—16 Tage alt) im Laufe von 4 Tagen zu 1—4 ccm injiziert. Obwohl denselben im ganzen um etliche Male mehr Gehirnsubstanz einverleibt wurde, als solchen, die lt. Tab. I und in meinen früheren mehrfachen Versuchen nach langdauernden Injektionen (ungefähr 24 Tage)

eine intrazerebrale Injektion überlebten, war dieses Quantum nicht genügend, um die Versuchstiere vor der intrazerebralen Infektion mit Straßenvirus zu schützen. Nur 1 Kaninchen blieb am Leben, aber auch dieses erkrankte 24 Tage nach der Trepanation. Es saß zusammengekauert, fraß nicht, fiel nach einem leichten Stoße um und konnte sich nicht mehr aufrichten. Allmählich aber erholte es sich. Es blieb vier Monate nach der Infektion unter Beobachtung und schien das Versuchstier in den letzten Wochen schon ganz gesund zu sein.

Tabelle II.

Tier	Immunisiert subkutan						Infiziert i. cer. mit Straßenvirus		Erkrankt nach wieviel Tagen	Tod nach wieviel Tagen	Todesursache	Bemerkungen
	Womit	Alter der Vakzine in Tagen	Zu wieviel Kubikzentimeter	Wieviel Tage	Wie oft	Gehirn in Gramm	Nach wieviel Tagen	Wann				
Kan. 195	10proz. Vakzine „58—60“	13—16	1	4	tägl.	0,4	10	25. 11. 24	12	13	Lyssa	.
196		13—16	1	4	„	0,4	10	dgl.	12	15	„	.
197		13—16	2	4	„	0,8	10	„	13	16	„	.
198		13—16	2	4	„	0,8	10	„	13	16	„	.
199		13—16	3	4	„	1,2	10	„	13	14	„	.
200		13—16	4	4	„	1,6	10	„	24	—	lebt	Erkrankt am 19. 12. 24. Ungefähr am 25. 3. 25 wieder gesund

Wir sehen daraus, daß bei den antirabischen Schutzimpfungen nicht soviel daran gelegen ist, große Quantitäten der Gehirnsubstanz einzuverleiben, als die Impfungen längere Zeit auszuüben, wenn im ganzen auch etwas weniger Impfmaterial injiziert wird.

Gestützt auf die früher publizierten und teilweise auf die hier angegebenen Versuche, habe ich die inaktivierte konservierte antirabische Vakzine „58—60“ für die Schutzimpfungen zuerst in Poltawa und jetzt in Swerdlowsk eingeführt. Die Zubereitung dieser Vakzine ist sehr einfach und wenig zeitraubend: Einmal in ungefähr 10 Tagen werden etliche ausgewachsene Kaninchen mit Virus fixe intrazerebral infiziert. Nach 6 Tagen werden dieselben während der Agonie (größere Kaninchen erliegen bei uns der Wut nach 7, kleinere nach 6 Tagen) auf dem Rücken fixiert, der Brustkasten bei noch lebenden Tieren eröffnet, das Blut aus dem Herzen mit einer sterilen Pipette der Kontrolle halber auf 2 Agarröhrchen gesät und das Herz mit einer Schere durchschnitten, worauf der Tod sofort eintritt. Danach wird das Gehirn mit einer Pipette in 2 Bouillonröhrchen gesät. Ein Stückchen des verlängerten Markes wird zwecks Weiterverimpfung in Glyzerin gebracht. Aus dem übrigen Material wird sofort von jedem Kaninchen gesondert in sterilen Gläsern oder Mörsern eine 10proz. Aufschwemmung zubereitet, dieselbe durch doppelte sterile Gaze filtriert und der flüssige Rest mit Hilfe eines Glasstäbchens durch die Gaze ausgedrückt. Das

Filtrat wird im Wasserbade auf 58—60 ° C während einer halben Stunde erwärmt, danach wird $^1/_2$proz. Ac. carbol. liquef. hinzugefügt und die Vakzine in den Eisschrank gestellt. Wenn nach 2 Tagen die Kontrollröhrchen (wenigstens 1 mit Agar und 1 mit Bouillon) sich als steril erweisen, was, beiläufig gesagt, bei solcher doppelten Kontrolle beinahe immer der Fall ist, so wird die Vakzine als brauchbar angesehen. Nach beliebiger Zeit verdünnt man sie bis auf 1 Proz. und fügt derselben noch Ac. carbol. liquef. hinzu, damit wiederum $^1/_2$ Proz. derselben verbleibt. Alle Flaschen für Kochsalzlösung und Vakzine (für letztere aus dunklem Glas) sind mit einer gewöhnlichen Feile graduiert, so daß alle Manipulationen schnell und mechanisch ausgeführt werden können.

Obwohl die Experimente gezeigt haben, daß die Vakzine, welche im Dunkeln im Eisschrank oder sogar bei Zimmertemperatur aufbewahrt wird, noch nach einigen Monaten brauchbar ist, habe ich vorläufig für Schutzimpfungen bei Menschen nur Vakzine im Alter von 7—40 Tagen benützt.

Die Schutzimpfungen werden im Laufe von 8—28 Tagen subkutan in die Bauchgegend täglich einmal zu $2^1/_2$ ccm bei leichteren und zu 3 ccm bei schwereren Verletzungen ausgeübt. Die Dauer hängt von der Schwere, der Lokalisation der Verletzungen etc. ab. Kindern und Erwachsenen wird dieselbe Dosis eingesprizt und dennoch vertragen erstere die Injektionen besser, da bei ihnen anaphylaktische Erscheinungen, wie Röte, Induration, Juckreiz an der Impfstelle etc. viel seltener zu beobachten sind. Ich möchte betonen, daß anaphylaktische Erscheinungen, wie ich früher schon beschrieben habe, auch beim Gebrauche der konservierten avirulenten Vakzine ungefähr am 7.—10. Tage nach Beginn der Behandlung vorkommen, jedoch sind dieselben viel gelinder als nach den Injektionen der ex tempore hergestellten antirabischen Rückenmarkaufschwemmung.

In Poltawa sind nach dieser Methode vom 25. 9. 24 bis 8. 4. 25 im ganzen 683 Personen schutzgeimpft und sind weder Paralysen noch Abszessse beobachtet worden. Da nur ca. 8 Mon. seitdem vergangen sind, kann man vorläufig noch nicht mit Sicherheit über die Wirkung dieser Vakzine urteilen. Es ist jedoch allbekannt, daß bei schweren Wunden die Gebissenen nicht selten während der Schutzimpfungen oder bald nach Beendigung derselben an Lyssa sterben. Alle Lyssatodesfälle werden im allgeminen sofort an den entsprechenden Wutschutzstationen auch ohne Empfang der diesbezüglichen Anfragezettel bekannt, da die Personen, welche mit dem Lyssakranken in Berührung kamen, sich sofort nach dem Tode desselben zu Schutzimpfungen einstellen. So sind im Poltawaer Pasteurinstitut in der 2. Hälfte des Jahres 1924 6 Personen registriert worden, welche nicht schutzgeimpft wurden und an Hydrophobie gestorben sind (4 starben nach 2 Mon., 1 nach $2^1/_2$ Mon. und 1 nach 3 Mon. nach dem Bisse).

Was die mit der Vakzine „58—60“ Schutzgeimpften anbelangt, so ist bis jetzt unseres Wissens noch niemand an Tollwut gestorben, obwohl sich darunter nicht wenige, von sicher lyssakranken Hunden schwer Verletzte befanden. So wurden mit der konservierten Vakzine „58—60“ Personen mit den in Tab. III angegebenen Verletzungen geimpft.

Tabelle III.

Kategorie der Tiere, welche verletzt haben	Leichte Verletzungen oder mit Speichel besudelt (8—20 Tage behandelt)	Mittelschwere Verletzungen (24 Tage behandelt)	Schwere Verletzungen (28 Tage behandelt)	Im ganzen
A (Negrische Körperchen gefunden oder positiver Tierversuch oder der Uebergang der Wut von Tier auf Tier nachgewiesen)	513	18	8	
B (Positive tierärztliche Sektion)		7	2	
Ca (Klinisches Bild der Tollwut)		81	24	
Cb (Tollwutverdacht weder bestätigt noch ausgeschlossen)		23	7	
D (Zur Beruhigung der Patienten, Tier gesund geblieben)				
	513	129	41	683

Wir sehen daraus, daß mittelschwere und schwere Verletzungen von sicher tollwütigen Tieren (A und B) oder von Tieren (Ca), bei denen das klinische Bild der Tollwut beobachtet wurde, in 140 Fällen beigebracht wurden und, wenn man noch die mittelschweren und schweren Verletzungen von unbekannten Tieren (Cb) mitzählt, so beträgt die Zahl der Fälle 170. Da die Mortalität bei nicht kurierten schweren und mittelschweren Verletzungen von sicher tollwütigen und verdächtigen Tieren sehr hoch ist, so würde man, falls das Immunisationsvermögen der konservierten Vakzine „58—60“ nicht hoch genug sein sollte, sehr viele Lyssatodesfälle in Poltawa registrieren müssen, wogegen bis jetzt, wie schon erwähnt, kein einziger Lyssatod bekannt geworden ist.

Es bleibt noch übrig, genauer festzustellen, welche Konzentration am besten wirkt und wie lange die Vakzine das Immunisationsvermögen beibehält; man könnte dieselbe dann auch außerhalb der Pasteurinstitute verwenden.

Aber auch beim Gebrauche dieser Vakzine innerhalb der Pasteurinstitute werden bei sehr guten Resultaten recht viele Kaninchen und viel Zeit gespart.

Dank dem freundlichen Entgegenkommen des Direktors des Swerdlowsker Bakteriologischen Instituts, des Herrn Prof. Dr. I. I. Stepanow-Grigorjew, bin ich auch jetzt noch imstande, diese Arbeit nach allen Richtungen fortzusetzen.

Zusammenfassung.

Beim Gebrauche der 1proz. konservierten Vakzine im Alter von 69—98 Tagen, welche während 30 Min. auf 58—60° C erwärmt und zu welcher danach $^1/_2$proz. Ac. carbol. liquef. hinzugefügt wurde, konnten Injektionen 1—12 Tage hintereinander 1mal täglich und bis 7malige Injektionen mit 4tägigen Intervallen keine genügende Immunität bei Versuchskaninchen gegen eine darauffolgende intrazerebrale Infektion mit Straßenvirus zustande bringen.

Nur nach einer 8maligen Injektion mit 4tägiger Zwischenzeit überlebte ein Kaninchen eine intrazerebrale Infektion. Die Immunität

war jedoch nicht von Dauer, da dieses Kaninchen, als es nach $4^1/_2$ Mon. nach der 1. Infektion zum 2. Mal i.zer. mit Straßenvirus inokuliert wurde, 20 Tage darauf der Wut erlag.

Nach 18- und 24tägiger Immunisation dagegen blieben die Kaninchen auch nach der 2. intrazerebralen Infektion mit virulentem Straßenvirus am Leben. Auch bei den früheren Versuchen wurden nach langdauernden Schutzimpfungen die besten Erfolge verzeichnet.

Von 6 Kaninchen, welchen im Laufe von 4 Tagen eine 10proz. konservierte Vakzine „58—60" einverleibt wurde, starben an Wut nach einer darauffolgenden i.zer. Infektion mit Straßenvirus 5, das 6., welchem am meisten injiziert wurde, erkrankte zwar an Wut, erholte sich jedoch allmählich. Da denselben um einige Male mehr Gehirnsubstanz inokuliert wurde, als solchen, welche nach langdauernden Injektionen (ca. 24 Tage) eine intrazerebrale Infektion mit Straßenvirus überlebten, so scheint nicht so viel daran gelegen zu sein, besonders große Quanten des Impfstoffes zu inokulieren, als die Impfungen längere Zeit auszuüben, wenn im ganzen auch etwas weniger Impfmaterial einverleibt wird.

Die 1proz. inaktivierte konservierte Vakzine „58—60" (+ $^1/_2$proz. Ac. carb. liquef.) hat sich nicht nur bei den Versuchen mit Tieren, sondern auch in der Praxis bei Menschen als durchaus gutes Tollwutschutzmittel erwiesen. Da langdauernde Impfungen bei den Versuchen mit Tieren stets die besten Resultate gegeben haben, so wurden die Gebissenen, welche schwere Verletzungen zeigten, 28 Tage hintereinander geimpft. 683 Personen sind nach dieser Methode gegen Tollwut geimpft und sind weder Paralysen noch Abszesse beobachtet und kein Lyssatod verzeichnet worden. Unter den Gebissenen hatten 129 mittelschwere und 41 schwere Verletzungen.

Die Vakzine „58—60" wird für die Dauer hergestellt und kann deshalb auch außerhalb der Pasteurinstitute gebraucht werden, aber auch beim Gebrauche derselben innerhalb der Wutschutzstationen sind bei recht erfreulichen Resultaten viele Kaninchen und viel Zeit zu sparen.

Ueber die Bildung heterogenetischer Antikörper bei Tieren des Meerschweinchentypus.

[Aus dem wissenschaftlichen Institut für mikrobiologische Untersuchungen an der Moskauer Medizinischen Hochschule (2. Staatsuniversität) (Direktor: Prof. Kritschewsky).]

Von Dr. **K. A. Friede.**

Die Frage der Bildung des heterogenetischen Hammelhämolysins bei Tieren des Meerschweinchentypus hat bereits die Aufmerksamkeit vieler Forscher auf sich gelenkt.

Ohne Zweifel ist die Frage, ob Tiere, die heterogenetische Antigene in ihren Organen enthalten, durch die Immunisierung mit diesen Antigenen, Antikörper, welche mit den Organen entsprechender Tiere gebunden sind, zu produzieren vermögen, von großem Interesse.

A priori war vorauszusetzen, daß im Blute der Tiere, welche heterogenetische Antigene in ihren Organen enthalten, keine heterogenetischen Hämolysine auffindbar sein werden. Und in der Tat fand ich diese Voraussetzung in der Literatur bestätigt.

Nach Forssman[1]) können Meerschweinchen, die mit Organen derselben Art immunisiert wurden, keine heterogenetischen Hammelhämolysine produzieren. Seine Experimente können selbstverständlich nicht als definitiv angesehen werden, weil für die Immunisierung ein Antigen derselben Art genommen wurde. Nach Amako[2]) wurden bei Immunisierung von Meerschweinchen mit Organen von Hunden, Schildkröten und Hühnern keine heterogenetischen Hammelhämolysine hervorgerufen.

Doerr und Pick[3]), die Meerschweinchen Organe von Pferden eingeführt hatten, haben auch ein negatives Resultat erhalten. In seiner Arbeit erwähnt Tsuneoka[4]) nur kurz, daß die Immunisation des Hundes und der Katze mit Organen (wessen?) keine Produktion heterogenetischer Hammelhämolysine hervorgerufen hat. Er konnte aber bei der Immunisierung von Meerschweinchen, Katzen und Hunden mit frischen und gekochten Hammelerythrozyten eine Produktion von Hämolysinen bei diesen Tieren hervorrufen, wobei bei der Immunisation mit gekochten Erythrozyten der Titer bedeutend (etwa 3mal) niedriger war.

I. L. Kritschewsky, der in Gemeinschaft mit mir[5]) die Frage der Zellanaphylaxie bei Hunden untersuchte, lenkte meine Aufmerksamkeit im Frühjahr 1922 darauf, daß Hunde gute Produzenten homologen Hammelhämolysins sind. Da ich nicht nur mit einem einzelnen heterogenetischen Antigen, dem Hammelantigen, wie es bis jetzt der Fall gewesen war, zu arbeiten die Möglichkeit hatte, sondern mir 3 Antigene (Hammel-, Schildkröten- und Hühnerantigen) zur Verfügung standen, habe ich Versuche mit der Immunisierung von Hunden und Meerschweinchen mit Erythrozyten vorgenommen.

Hunde und Meerschweinchen wurden mit 3mal gewaschenen und mit physiologischer Kochsalzlösung zur Hälfte verdünnten Hammel- und Hühnererythrozyten immunisiert. Die Erythrozyten wurden 2mal mit einer Unterbrechung von einer Woche injiziert. Nachdem eine Woche nach der zweiten Injektion verstrichen war, wurde eine Probe entnommen. Die Erythrozyten wurden in die Ohrvene, zuweilen, wenn die Venen sehr zart und fein waren, auch i.p. eingespritzt. (Bei Meerschweinchen wurden die Injektionen stets i.p. gemacht.)

Das erste Mal wurden 0,5 ccm Erythrozyten, das zweite Mal 1 ccm injiziert. Zum Versuch wurden 0,75 ccm der Flüssigkeit verwendet (0,25 ccm Serum 1:100—1:1000; 0,25 ccm Komplement 1:10 und 0,25 ccm einer 5proz. Erythrozytenemulsion).

Die Resultate wurden nach 2std. Stehen im Brutschrank, während welcher Zeit die Röhrchen nach jeder Viertelstunde umgeschüttet wurden,

1) Forssman, Biochem. Ztschr. Bd. 77. 1916.
2) Amako, Ztschr. f. Immunitätsforschung. Bd. 22. 1914.
3) Doerr u. Pick, Biochem. Ztschr. Bd. 60. 1914.
4) Tsuneoka, Ztschr. f. Immunitätsforschung. Bd. 22. 1914.
5) K. Friede, Zur Frage über die Mannigfaltigkeit der heterogenischen Antigene. Ztschr. f. Pathol., Mikrobiol. und Infektionskrankh. 1924 (russisch).

abgelesen. Bei der Arbeit mit kernhaltigen Erythrozyten wurde der Grad der Hämolyse nach der Zentrifugierung im spitzen Uhlenhuth-Röhrchen bestimmt. Die Beurteilung der erfolgten Hämolyse geschah nach der Stärke der Färbung der Wassersäule, nach der Dichte der weißen Schicht der ausgelaugten Erythrozyten und nach der An- oder Abwesenheit und Dicke der roten Schicht der unbeschädigten Erythrozyten[1]). Bei der Arbeit mit Schildkrötenerythrozyten wurden sie mit einer physiologischen Lösung, welche nicht, wie gewöhnlich 0,85 Proz., sondern nur 0,6 Proz. Kochsalz enthielt, gewaschen[2]). Die Verdünnung aller für die Reaktion gebrauchten Ingredientien wurde mit derselben Lösung vorgenommen.

Während bei Hunden, die mit Hühnererythrozyten immunisiert wurden, der Serumtiter für letztere 1:1000 war, traten keine Spuren von Hämolyse der Hammel- und Schildkrötenerythrozyten auch bei der Verdünnung des Serums 1:100 auf (Tabelle 1).

Tabelle 1.

Immunisierung der Hunde mit Hühnererythrozyten.

Verdünnung des Serums	Der Gehalt des Serums an Hämolysinen für Erythrozyten von											
	Hammel				Huhn				Schildkröte			
	Nr. der Tiere				Nr. der Tiere				Nr. der Tiere			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1:100	0	0	0	0	k. H.	f. k. H.	k. H.	k. H.	0	0	0	0
1:200	"	"	"	"	dgl.	p. H.	dgl.	k. H.	"	"	"	"
1:300	"	"	"	"	"	dgl.	"	f. k. H.	"	"	"	"
1:400	"	"	"	"	"	"	p. H.	f. k. H.	"	"	"	"
1:500	"	"	"	"	"	Sp. H.	p. H.	p. H.	"	"	"	"
1:700	"	"	"	"	"	0	Sp. H.	p. H.	"	"	"	"
1:900	"	"	"	"	"	0	Sp. H.	Sp. H.	"	"	"	"
1:1000	"	"	"	"	"	0	0	Sp. H.	"	"	"	"
3 K.	"	"	"	"	0	0	0	0	"	"	"	"

Bei den mit Hühnererythrozyten immunisierten Meerschweinchen erreichte der Titer für diese 1:500; es wurde aber keine Hämolyse von Hammelerythrozyten selbst bei einer Verdünnung des Serums 1:100 bemerkt (Tabelle 2). Dadurch wurde festgestellt, daß bei der Immunisierung von Hunden und Meerschweinchen mit Hühnererythrozyten, die, wie bereits früher konstatiert wurde[3]), heterogene Hammel- und Schildkrötenantigene enthalten, keine heterogenetischen Antikörper für Hammel- und Schildkrötenerythrozyten im Serum der immunisierten Tiere zu entdecken sind.

Dasselbe Bild bekommt man bei der Immunisierung von Hunden und Meerschweinchen mit Hammelerythrozyten: Eine komplette Hämolyse von homologischen Hammelerythrozyten mit dem Serum von Hunden fand bei einer Verdünnung bis 1:500 statt; es wurde aber keine Spur

1) Bei der Arbeit mit kernhaltigen Erythrozyten wird die Flüssigkeit sogar beim Eintritt einer kompletten Hämolyse nicht ganz klar, wie wir dieses bei der kompletten Hämolyse der kernlosen Erythrozyten gewohnt sind; deswegen ist in diesem Fall die gewöhnliche Bestimmung des Grades der Hämolyse nicht durchzuführen.

2) Eine solche Kochsalzlösung ist für Erythrozyten der Kaltblüter isotonisch.

3) Kritschewsky, J. L., Journ. of exper. Med. Vol. 24. 1916. No. 3. Friede, loc. cit.

Tabelle 2.

Immunisierung der Meerschweinchen mit Hühnererythrozyten.

Verdünnungen des Serums	Der Gehalt des Serums an Hämolysinen für Erythrozyten von							
	Hammel				Huhn			
	Nr. der Tiere				Nr. der Tiere			
	526	527	528	535	526	527	528	535
1:100	0	0	0	0	f. k. H.	k. H.	k. H.	k. H.
1:200	"	"	"	"	k. H.	dgl.	k. H.	k. H.
1:300	"	"	"	"	k. H.	"	f. k. H.	f. k. H.
1:400	"	"	"	"	f. k. H.	"	dgl.	k. H.
1:500	"	"	"	"	p. H.	"	"	f. k. H.
1:700	"	"	"	"	Sp. H.	f. k. H.	p. H.	p. H.
1:900	"	"	"	"	dgl.	p. H.	Sp. H.	dgl.
1:1000	"	"	"	"	"	p. H.	Sp. H.	"
3 K.	"	"	"	"	0	0	0	0

einer Hämolyse von Hühner- und Schildkrötenerythrozyten selbst bei einer Verdünnung 1:100 beobachtet (Tabelle 3).

Tabelle 3.

Immunisierung der Hunde mit Hammelerythrozyten.

Verdünnung des Serums	Der Gehalt des Serums an Hämolysinen für Erythrozyten von											
	Hammel				Huhn				Schildkröte			
	Nr. der Tiere				Nr. der Tiere				Nr. der Tiere			
	119	120	5	6	119	120	5	6	119	120	5	6
1:100	k. H.	k. H.	k. H.	k. H.	0	0	0	0	0	0	0	0
1:200	dgl.	k. H.	k. H.	dgl.	"	"	"	"	"	"	"	"
1:300	"	f. k. H.	p. H.	"	"	"	"	"	"	"	"	"
1:400	f. k. H.	dgl.	dgl.	"	"	"	"	"	"	"	"	"
1:500	dgl.	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
1:700	"	"	"	p. H.	"	"	"	"	"	"	"	"
1:900	p. H.	p. H.	"	dgl.	"	"	"	"	"	"	"	"
1:1000	p. H.	p. H.	Sp. H.	"	"	"	"	"	"	"	"	"
3 K.	0	0	0	0	"	"	"	"	"	"	"	"

Bei Meerschweinchen hat der Titer für homologe Erythrozyten eine Höhe von 1:500 erreicht, die Hämolyse von Hühnererythrozyten trat auch bei einer Verdünnung von 1:100 nicht ein (Tabelle 4). Und

Tabelle 4.

Immunisierung der Meerschweinchen mit Hammelerythrozyten

Verdünnungen des Serums	Der Gehalt des Serums an Hämolysinen für Erythrozyten von						Bemerkungen
	Hammel			Huhn			
	Nr. der Tiere			Nr. der Tiere			
	529	533	537	529	533	537	
1:100	k. H.	k. H.	k. H.	0	0	0	k. H. = komplette Hämolyse,
1:200	dgl.	dgl.	dgl.	"	"	"	f. k. H. = fast kompl. Hämol.,
1:300	"	"	"	"	"	"	p. H. = partielle Hämolyse,
1:400	"	"	"	"	"	"	Sp. H. = Spur der Hämolyse,
1:500	"	"	"	"	"	"	0 = keine Hämolyse,
1:700	f. k. H.	"	"	"	"	"	3 K. = 3 Kontrollen (Kontr.
1:900	f. k. H.	"	f. k. H.	"	"	"	der Erythrozyten, des Se-
1:1000	p. H.	f. k. H.	f. k. H.	"	"	"	rums und Komplements als
3 K.	0	0	0	"	"	"	solchen).

Zusammenfassende Tabelle I.

Sera der Hunde, immunisiert mit Hammel- und Hühnererythrozyten. Hämolyse der Hammel-, Hühner- und Schildkrötenerythrozyten.

Immunisierung mit Erythrozyten von:	Verdünnungen d. Serums	Hämolyse der Erythrozyten von			Immunisierung mit Erythrozyten von:	Verdünnungen d. Serums	Hämolyse der Erythrozyten von		
		Hammel	Huhn	Schildkröte			Hammel	Huhn	Schildkröte
Hammel	1:100	+ + + +	— — — —	— — — —	Huhn	1:100	— — — —	+ + + +	— — — —
	1:200	+ + + +	— — — —	— — — —		1:200	— — — —	+ + + +	— — — —
	1:300	+ + + +	— — — —	— — — —		1:300	— — — —	+ + + +	— — — —
	1:400	— + + +	— — — —	— — — —		1:400	— — — —	+ + + +	— — — —
	1:500	— + + +	— — — —	— — — —		1:500	— — — —	+ + + +	— — — —
	1:700	— + + +	— — — —	— — — —		1:700	— — — —	+ + + +	— — — —
	1:900	— — + +	— — — —	— — — —		1:900	— — — —	+ + + +	— — — —
	1:1000	— — + +	— — — —	— — — —		1:1000	— — — —	+ + + +	— — — —
	3 K.	— — — —	— — — —	— — — —		3 K.	— — — —	— — — —	— — — —

+ + + + = komplette Hämolyse,
— + + + = fast komplette Hämolyse,
— — + + = partielle Hämolyse,
— — — — = keine Hämolyse,
3 K. = 3 Kontrollen (Kontrolle der Erythrozyten, des Serums und des Komplements als solchen).

Zusammenfassende Tabelle II.

Sera der Hunde, immunisiert mit Katzenniere. Hämolyse der Hammel-, Hühner- und Schildkrötenerythrozyten.

Verdünnungen des Serums	Hämolyse der Erythrozyten von		
	Hammel	Huhn	Schildkröte
1:100	— — — —	— — — —	— — — —
1:200	— — — —	— — — —	— — — —
1:300	— — — —	— — — —	— — — —
1:400	— — — —	— — — —	— — — —
1:500	— — — —	— — — —	— — — —
1:700	— — — —	— — — —	— — — —
1:900	— — — —	— — — —	— — — —
1:1000	— — — —	— — — —	— — — —
3 K.	— — — —	— — — —	— — — —

doch, wie die Versuche an Kaninchen gezeigt haben, enthalten die Hammelerythrozyten heterogenetische Antigene von Hühnern und Schildkröten[1]).

Obwohl die Hammelerythrozyten heterogenetische Hühner- und Schildkrötenantigene enthalten, kann man bei der Immunisierung der Hunde mit Hammelerythrozyten keine heterogenetischen Antikörper für Hühner- und Schildkrötenerythrozyten entdecken.

Bei der Immunisierung von Hunden mit Katzenniere[2]) habe ich im Serum der Hunde keine Hämolysine weder für Hammel- noch für

1) Kritschewsky, loco cit.; Friede, loco cit.

2) Die Niere wurde mit Hilfe einer Schere fein zerschnitten und mit physiologischer Lösung in einem Mörser zerrieben; darauf wurde die Emulsion durch Mull filtriert und den Hunden i.p. in einer Menge von 0,5 ccm und 1,0 ccm mit einer Unterbrechung einer Woche injiziert. Eine Probe wurde eine Woche nach der zweiten Injektion entnommen.

Hühner- oder Schildkrötenerythrozyten entdeckt (Tabelle 5), obwohl die Anwesenheit von drei heterogenetischen Antigenen, die zu den drei erwähnten Tierarten gehören, in der Katzenniere festgestellt ist.

Tabelle 5.
Immunisierung der Hunde mit Katzenniere.

Verdünnungen des Serums	Der Gehalt des Serums an Hämolysinen für Erythrozyten von											
	Hammel				Huhn				Schildkröte			
	Nr. der Tiere				Nr. der Tiere				Nr. der Tiere			
	7	8	581	582	7	8	581	582	7	8	581	582
1:100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1:200	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
1:300	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
1:400	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
1:500	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
1:700	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
1:900	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
1:1000	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
3 K.	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"

Auf Grund der oben erwähnten Experimente kann man annehmen, daß im Gegensatz zu den Kaninchen bei der Immunisierung von Hunden und Meerschweinchen mit Erythrozyten oder Organen, welche heterogenetische Antigene enthalten (Hammel-, Hühner- und Schildkrötenantigene) keine Bildung von heterogenetischen Hämolysinen stattfindet; sollte jedoch eine solche Bildung tatsächlich stattfinden, so müßte angenommen werden, daß diese Antikörper sogleich nach ihrer Entstehung von Tierorganen gebunden werden.

Zur Klärung der Frage, ob hier die Bildung heterogenetischer Hämolysine ausbleibt, oder ob hier eine Bindung heterogenetischer Hämolysine stattfindet, habe ich vor, eine Reihe von weiteren Versuchen auszuführen.

Zusammenfassung.

In Immunsera von Tieren des Meerschweinchentypus, die mit Erythrozyten und Organen behandelt sind, welche heterogenetische Antigene enthalten, sind keine heterogenetischen Antikörper nachweisbar.

Ueber die Existenz von Zytotoxinen.

[Aus dem Wissenschaftlichen Institut für mikrobiologische Untersuchungen an der Moskauer Medizinischen Hochschule (2. Staatsuniversität) und aus dem Laboratorium für Untersuchung von chemotherapeutischen Präparaten des Reichs-Anilintrusts (Direktor: Prof. Dr. I. L. Kritschewsky).]

Von Dr. med. **K. A. Friede.**

In der wissenschaftlichen Literatur, die wir mit Prof. Kritschewsky während unserer gemeinschaftlichen Untersuchung [1]) der

1) Kritschewsky u. Friede, Ztschr. f. Pathol., Mikrobiol. und Infekt.-Krankh. 1924. [russisch.]

bei Anaphylaxie und dieser ähnlichen und verwandten Zustände eintretenden pathologisch-anatomischen Veränderungen kennen lernten, sind wir mehrmals auf Arbeiten gestoßen, welche der Untersuchung verschiedener zellulärer Gifte (Zytotoxine) gewidmet waren. Ihre Verfasser haben zumeist den klinischen Symptomenkomplex, ebenso wie den Tod der Versuchstiere und die in den Organen der letzteren eintretenden pathologisch-anatomischen Veränderungen durch die Anwesenheit von Toxinen im Blute der mit irgendeinem Organ immunisierten Tiere, die auf das betreffende Organ wirken, zu erklären gesucht.

Wir haben jedoch bemerkt, daß ein ganz identischer klinischer Symptomenkomplex und gleiche pathologisch-anatomische Veränderungen auch bei der Untersuchung von solchen Prozessen konstatiert werden, bei welchen keine zellulären Toxine entstehen konnten, z. B. nach Injektion mancher Normal- und Immunsera, bei Anaphylaxie, bei Todesfällen nach der Einführung von artfremden Erythrozyten, Organextrakten, deren Ursache, wie Prof. Kritschewsky erwiesen hat[1]) und durch die vorliegende Arbeit bestätigt wird, in den auf dem Zellterritorium entstehenden physikalisch-chemischen Veränderungen, d. h. in einer Störung des Dispersionsgrades der Organismuskolloide, liegt.

Mehrere, nach der Einführung von sog. „zytotoxischen" Sera in einen Tierorganismus entstehende Prozesse erfahren eine ganz neue Erklärung durch die physikalisch-chemische Theorie, welche von Prof. Kritschewsky in einer Reihe von Untersuchungen[2]) erörtert und auch weiterhin in unserem Institut bearbeitet und immer durch neue Argumente gestützt wird. Natürlicherweise lag es nahe, die Frage von der Existenz der Zytotoxine zu revidieren und zu versuchen, manche Erscheinungen, die im Tierorganismus nach der Einführung von verschiedenen Zellgiften auftreten, anders zu erklären, als es bisher geschehen war. Auf Anregung von Herrn Prof. Kritschewsky habe ich mich mit diesem Thema befaßt.

Den Zytotoxinen ist eine große Anzahl von Untersuchungen gewidmet worden. Es gibt kein Organ, welches zur Darstellung eines zytotoxischen Serums nicht gebraucht worden ist, so daß Rößle[3]) sehr richtig bemerkt, es bleibe den Forschern nunmehr nur noch die Herstellung eines Antinabelschnurserums übrig.

Ich gebe zunächst eine kurze Literaturübersicht und gruppiere dabei die Untersuchungen nach den Organen, gegen welche die Autoren entsprechende Lysine zu gewinnen suchten; ich erwähne hier nur die Hämolysine und Spermolysine nicht, da von denselben weiter die Rede sein wird. Zunächst haben die Neurolysine und Nephrolysine die Aufmerksamkeit der Forscher erregt.

Delezenne[4]) hat Enten mit emulgiertem Hundegehirn immunisiert. Bei Hunden, denen das Immunserum solcher Enten injiziert wurde, entstanden Krämpfe, Parese, Lähmungen, Salivation und Polyurie, wonach der Tod eintrat. Pironé[5]) hat gleiche Versuche angestellt, aber nur in einem Falle einen letalen Ausgang erhalten. Obwohl er denselben der Wirkung von Neurolysinen zuschreibt, ist es wahr-

---

1) Kritschewsky, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 92. 1924. — Ders., Journ. Infect. Dis. Vol. 22. 1918. — Ders., Arch. f. Dermat. u. Syphilis. Bd. 144. 1923. — Ders. u. Friede, Ibid.

2) Kritschewsky u. Bierger, Journ. of Immunol. Vol. 9. 1924. No. 5.

3) Rößle, Lubarsch-Ostertag, Ergebn. f. allgem. Pathol. u. pathol. Anat. 1910.

4) Delezenne, Ann. de l'Instit. Pasteur. 1900. No. 10.

5) Pironé, Arch. russe de scienc. biolog. T. 10. 1903.

scheinlich, daß der Hund infolge eines anaphylaktischen Shocks gestorben ist, da ihm 1 Monat vor der Einführung von Immunserum normales Entenserum verabfolgt worden war. In allen anderen Fällen erholten sich die Versuchstiere vollständig, nachdem die Krämpfe vergangen waren und sie sich einige Zeit in einem komatösen Zustande befunden hatten. Pironé hat im Gehirn solcher Hunde eine Hyperämie der Kapillargefäße in den Hirnhäuten und in der Rinde, eine Leukozyteninfiltration in der Umgebung der Blutgefäße, Neurophagie und Zerfall der Nißlschen Substanz beobachtet.

Bei Hunden, welche normales Entenserum erhielten, hat Pironé ebenfalls eine Dilatation der Kapillargefäße, Neurophagie und das Anfangsstadium von Chromatolyse beobachtet. Es konnte auch kein Unterschied zwischen der Wirkung von Normalserum und Immunserum auf Hirngewebe in vitro konstatiert werden.

Armand-Delille [1]), welcher für seine Versuche dieselbe Tierart benutzt hat, hat bei Hunden Schläfrigkeit, Temperaturabnahme und Tod konstatiert. Im Gehirn solcher Hunde hat er Hyperämie, kleine Blutungen, „état poussiereux" der Nervenzellen — eine Zerstäubung der Nißlschen Substanz (vermutlich Chromatolyse), und Zellen, die bei der Färbung nach Nißl hellblau erschienen (vermutlich Achromatose) beobachtet. Mehrere Zellen waren von runden, intensiv gefärbten Elementen umringt (das Anfangsstadium der Neurophagie?).

Enriquez und Siquard [2]) haben bei Hunden, denen neurotoxisches Kaninchenserum eingeführt worden war, epileptiforme Anfälle und einen Depressionszustand beobachtet, welchem jedoch Tod nicht folgte.

Ravenna gelang es, nur ein schwach wirkendes unspezifisches Serum zu erzeugen.

Schmidt [3]) hat ein Serum gewonnen, welches auf periphere Nerven toxisch wirkte, dessen lähmende Dosis jedoch öfters den Tod herbeiführte, d. h. das Serum besaß außer seiner lokalen Wirkung auch eine allgemeine.

Hier müssen auch die Versuche von Baroncini u. Giacometti, welche über ein positives Resultat berichten, und die von Rehns u. Donath, denen es nicht gelungen ist, ein neurotoxisches Serum zu erhalten, erwähnt werden.

Choroschko [4]) hat bei Meerschweinchen, denen heteroneurotisches Serum eingeführt worden war, Hyperämie, Blutungen, Chromatolyse und Achromatose in Großhirn, Rückenmark und verlängertem Gehirn beobachtet; er bezeichnet die in den Nervenzellen konstatierten Veränderungen als eine Chromatolyse; da er aber außer der Abwesenheit der Nißlschen Substanz auch eine sehr schwache Färbung der Nervenzellen konstatiert, infolge deren er solche Zellen „Schattennervenzellen" nennt, kann auch hier Achromatose vermutet werden. Choroschko hat auch in allen Teilen des Nervensystems eine stark ausgesprochene Neurophagie beobachtet. Die klinischen Symptome bestanden in Dyspnoe, Krämpfen, Paresen und Lähmungen, denen der Tod folgte.

Auch über Nephrotoxine ist eine umfangreiche Literatur vorhanden.

Lindemann [5]) hat bei Kaninchen, denen das Serum von mit Kaninchennieren immunisierten Meerschweinchen eingeführt worden war, akute Albuminurie und tödlichen Ausgang beobachtet. Die Untersuchung der Nieren der Versuchstiere hat eine Nekrose des Epithels der gewundenen Harnkanälchen, eine Umwandlung derselben in kompakte körnige Massen und die Anwesenheit von körnigen Zylindern im Lumen der geraden Kanälchen ergeben.

Bierry [6]) hat Ligaturen an den Art. renales bei Hunden angelegt; das Serum solcher Hunde verursachte, normalen Hunden eingeführt, Albuminurie.

Bierry und Pettit [7]) haben Hunden das Serum eines mit Nukleoproteiden der Hundeniere immunisierten Kaninchens eingeführt, wonach bei den Versuchstieren Albuminurie konstatiert werden konnte. In ihren Nieren wurden Hyperämie, fettige Degeneration, Blutungen im intrakanalikularen Bindegewebe und Bildung von körnigen Zylindern gefunden. Es wurden jedoch gleiche Veränderungen auch in der Leber konstatiert, d. h. parenchymatöse und fettige Degeneration, Hyperämie, Vakuolisierung der Leberzellen.

Herzen [8]) berichtet, daß nach der Einführung von isonephrolytischem Serum

1) Armand-Delille, Ann. Instit. Pasteur. 1906.
2) Enriquez et Siquard, Compt. Rend. Soc. de Biol. 1900.
3) Schmidt, Ann. Instit. Pasteur. 1906.
4) Choroschko, Dissert. 1912.
5) Lindemann, Ann. Pasteur. 1900.
6) Bierry, Compt. Rend. Soc. Biol. 1901.
7) Bierry et Pettit, Compt. Rend. 1904.
8) Herzen, Ueber das Nephrolysin. Dissert.

in den Nieren der Versuchskaninchen sichtbare Veränderungen angetroffen werden konnten; bei mikroskopischer Untersuchung fanden sich Hyperämie der Glomeruli und körnige Massen im Lumen der Bowmanschen Kapsel. Die Harnkanälchen waren ungleich intensiv gefärbt; entweder war kein Lumen in denselben zu sehen, oder dasselbe war mit körnigen oder hyalinen Massen und desquamierten Epithelzellen verstopft. Das Epithel der Harnkanälchen war zuweilen vakuolisiert.

Hier müssen auch die Arbeiten von Albarran u. Bernard, Hulot u. Ramond, Cioffi, Fiori erwähnt werden, einige von ihnen werden weiter unten nochmals zitiert werden.

Hepatotoxine sind von Delezenne, Bierry und Mayer, Deutsch[1]), Marassini erzeugt worden.

Delezenne[2]) hat Enten mit Hundeleber immunisiert. Hunde, denen solches Immunserum eingeführt worden war, starben binnen 15—20 Std. unter Symptomen von Leberinsuffizienz. Die pathologisch-anatomische Untersuchung zeigte eine akute gelbe Atrophie der Leber.

Bierry u. Mayer[3]) haben Hunden das Serum von einem mit Nukleoproteiden der Hundeleber immunisierten Kaninchen eingeführt, wonach sie parenchymatöse und fettartige Degeneration und Vakuolisierung der Leberzellen beobachtet haben.

Mankowsky[4]), Gontscharnikoff[5]), Demoor u. Van Lint[6]), Sartirana*), Partis u. Lüdke*) haben thyreotoxisches Serum, Surmont[7]), Bierry u. Carnot*) Pankreotoxin, Ferranini*), Centanni*) u. Ravenna*) Kardiotoxin erzeugt. v. Dungern[8]) hat ein Serum gegen Flimmerepithel gewonnen, Bigard und Bernard[9]), Sartirana[10]), Leon della Vida*) haben Antinebennierenserum, Theonari et Babes*), Lion et Français*), Bolton*) ein gastrotoxisches Serum gewonnen. Belonowsky*) hat versucht, Antidarmserum zu gewinnen, jedoch haben seine Versuche zu keinem bestimmten Resultat geführt. Schrobansky*) hat Ovariotoxin, Schücking*) Metrotoxin, Collini*) Hypophysistoxin erzeugt. Leukotoxine sind von Metschnikoff, Besredka[11]), Delezenne u. Funk[12]) dargestellt worden.

Metschnikoff[13]), Metalnikoff[14]), Moxter[15]) und London[16]) ist es gelungen, indem sie Versuchstiere mit Spermatozoiden immunisierten, ein Serum zu gewinnen, welches die letzteren in vitro immobilisierte.

Auf Grund der zitierten Literatur bin ich zu dem mit der oben erwähnten Arbeit von Prof. Kritschewsky und mit mehreren anderen, der Frage von der Toxizität von Normal- und Immunseren gewidmeten Arbeiten übereinstimmenden Schluß gekommen, daß eine große Anzahl von Todesfällen und die pathologisch-anatomischen Veränderungen, welche in den Organen der Versuchstiere konstatiert werden, durch keine spezifische zytolytische Wirkung der gegen irgendein Organ gewonnenen Immunsera, sondern durch die Einführung von artfremdem Normal- oder Immunserum, d. h. von artfremdem Eiweißstoff verursacht sind. Deshalb habe ich mich entschlossen, die in den Organen der nach Einführung von Normal- oder Immunserum, Organextrakten usw. einge-

---

1) Deutsch, Münch. med. Woch. 1899.
2) Delezenne, Semaine Médic. 1900.
3) Bierry et Mayer, Compt. Rend. Soc. Biol. 1904.
4) Russ. Arch. 1902.
5) Zitiert nach Fleischmann u. Davidson, Fol. Serolog. Bd. 1. 1908.
6) Demoor et Van Lint, Mémoir Acad. Royale méd. de Belgique. 1903.
7) Surmont, Ann. Instit. Pasteur. 1901.
8) v. Dungern, Münch. med. Woch. 1899.
9) Bigard et Bernard, Compt. Rend. Soc. Biol. 1901.
10) Sartirana, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 36 u. 37. 1904.
11) Besredka, Annal. Pasteur. 1900.
12) Funk, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 27. 1900.
13) Metschnikoff, Annal. Pasteur. 1900.
14) Metalnikoff, Annal. Inst. Pasteur. 1900.
15) Moxter, Dtsch. med. Woch. 1900. Nr. 4.
16) London, Arch. russe des Scienc. Biolog. T. 9. 1901.
*) Zitiert nach Fleischm. und Dawids., loco cit.

gangenen Tiere beobachteten Veränderungen nochmals genau zu untersuchen und sie mit denen, welche bei der Untersuchung von Zytotoxinen konstatiert werden, zu vergleichen.

Die Wirkung von normalen Tierseris auf verschiedene Organe ist bereits von mehreren Autoren untersucht worden. Es ist bekannt, daß Aalserum auf viele Zellarten toxisch wirkt, darunter auf Nervenzellen [Kossel u. Westphal [1]] und auf das Nierenepithelium (Bierry, Lindemann) [2]. Bei der Einführung von Aalserum entstehen bei den Versuchstieren Krämpfe, Paresen, Lähmungen und Störungen des Herz- und Atmungsapparates [Mosso [3]), Camus u. Gley [4]].

Natterserum, Schildkrötenserum und Froschserum sind nach Delezenne ebenfalls toxisch, wenn sie intrazerebral eingeführt werden; die meisten Autoren, die sich mit Neurotoxinen befaßt haben, haben gleichfalls die intrazerebrale Einführungsmethode angewandt. (Das von Delezenne erzeugte Serum blieb bei intravenöser und subkutaner Einführung unwirksam. Ich glaube, daß der Grund eines solchen Phänomens nicht in der elektiven neurotoxischen Wirkung, sondern im direkten Kontakt des Toxins in hoher Konzentration mit der Hirnsubstanz liegt.) Delezenne hat auch zwei Todesfälle bei Kontrollhunden, welchen normales Entenserum intrazerebral eingeführt worden war, beschrieben. Pironé hat bei einem Hunde, welcher normales Entenserum erhalten hatte, Veränderungen an der Hirnsubstanz feststellen können. Cioffi beschreibt degenerative Erscheinungen in der Leber und Niere bei Tieren, denen Nephrolysine, Menschenserum, Leber- oder Hodenextrakt eingeführt worden war. Claude Bernard [5]) notiert, daß die Einführung von normalem Tierserum Albuminurie bei Kaninchen verursacht. Weiß hat dasselbe Phänomen bei Kaninchen, denen artfremdes Serum injiziert worden war, beobachtet. Die Albuminurie wird, wie bekannt, von den Autoren als ein die Einführung von Nephrolysinen begleitendes, wichtiges Symptom betrachtet. Carré u. Vallée [6]) erwähnen, daß die Einführung von Ochsenserum auf Meerschweinchen tödlich wirkt. Lenossier u. Lemoine [7]) haben bei Kaninchen Albuminurie und schwere Nierenerkrankungen nach intraperitonealer Einführung von Pferde-, Menschen- oder Ochsenserum beobachtet. Sie sind der Meinung, daß diese Prozesse mit denen, welche nach der Einführung von Nephrotoxin stattfinden, identisch und nicht minder ernst, als die letzteren sind.

Flissinger [8]) hat nach Einführung von hämolytischem Serum Vakuolisierung und Degeneration der Leberzellen gesehen. Nach Boerri [9]) wirkt hämolytisches Serum wie Neurotoxin.

Choroschko [10]) berichtet über Kontrollversuche, bei denen Meerschweinchen hämolytisches Antimeerschweinchenerythrozytenserum injiziert erhielten, wonach die Tiere starben und bei der Sektion Achromatose und Chromatolyse der Nervenzellen und parenchymatöse Degeneration in den Nieren erkennen ließen.

Ich muß hier bemerken, daß die Prozesse, welche Choroschko in der oben erwähnten Arbeit als heteroneurotoxische Serumwirkung ansieht, in der Tat als ein Resultat der Wirkung von Immunserum betrachtet werden müssen. So kann man die Einführung von heteroneurotoxischem Serum bei Meerschweinchen und die Einführung von Antihammelerythrozytenserum bei denselben Tieren für identisch halten, da, wie bekannt, die Immunisierung mit Meerschweinchenorganen eine Bildung von Hämolysinen gegen Hammelerythrozyten verursacht. Die Fälle, welche gewöhnlich durch die toxische Wirkung der Endotoxine des Nervengewebes erklärt werden, sind nur Sonderfälle, in welchen Organextrakte ihre toxische Wirkung aufweisen.

Es ist auch bekannt, daß Organextrakte giftig wirken; eine Einführung derselben verursacht anatomische Veränderungen, die den der spezifischen Wirkung von zellulären Giften zugeschriebenen Veränderungen gleich sind.

Nach Fiori [11]) wirkt emulgiertes Nierengewebe auf Nieren weit stärker, als

1) Zitiert nach Delezenne, Annal. Pasteur. 1900.
2) Ibid.
3) Ibid.
4) Ibid.
5) Zitiert nach Lindemann, Annal. Pasteur. 1900.
6) Carré et Vallée, Compt. Rend. Soc. Biol. 1903.
7) Zitiert nach Rößle.
8) Flissinger, Compt. Rend. Soc. Biol. 1907.
9) Zitiert nach Fleischmann u. Dawidson, Fol. Serolog. 1908. Nr. 1.
10) Choroschko [Dissert.] 1912.
11) Zitiert nahc Fleischmann u. Dawidson.

Serum von Tieren, welche mit Nierengewebe präpariert wurden; solches Serum wirkt aber weit mehr auf das allgemeine Befinden des Versuchstieres, als auf den Zustand seiner Nieren.

Choroschko berichtet über Todesfälle bei Kaninchen, denen emulgiertes Kaninchengehirn intravenös injiziert worden war; das klinische Bild war dabei höchst typisch: Krämpfe, Exophthalmus, Dyspnoe.

Hulot u. Ramond[1]) haben in der Leber von Tieren, welche mit Lebergewebe immunisiert wurden, Blutungen und fettige Degeneration beobachtet und schließen hieraus, daß die Einführung von Leberzellen die Bildung einer hepatolytischen Substanz verursacht. Es ist jedoch nicht zu verstehen, warum alsdann auch Gefäßstörungen vorhanden sind.

Marassini[2]) hat gleiche Erscheinungen in Leber und Nieren von Meerschweinchen und Kaninchen, denen emulgierte Kaninchenleber eingeführt worden war, konstatiert; sie konnten auch bei normalen Tieren, denen in zuvor erwähnter Weise erhaltenes Kaninchenimmunserum eingeführt worden war, beobachtet werden; in beiden Fällen waren die degenerativen Erscheinungen weit schärfer im Nierenepithel als in den Leberzellen ausgedrückt. Der Autor erhielt ein gleiches Resultat, wenn er anstatt eines normalen Lebergewebes Lebernukleoproteide für die Immunisierung benutzte

Ich glaube, die bisher angeführten Fälle sind zahlreich genug, um weitere Beispiele unnötig zu machen.

Nunmehr will ich über meine eigenen Versuche berichten.

Ich hatte mir als Ziel gesetzt, durch Einführung von Normal- und Immunseren und verschiedenen anderen Stoffen das klinische und hauptsächlich das pathologisch-anatomische Bild wiederzugeben, welches andere Autoren bei der Einführung verschiedener neuro-, nephro-, hepato-toxischer und anderer zytotoxischer Seren erhalten haben und welches sie der spezifischen zytotoxischen Wirkung der Sera auf die entsprechenden Organe, mit deren Gewebe die Tiere immunisiert waren, zugeschrieben haben; damit wollte ich beweisen, daß in solchen Fällen die Sera keine „zytotoxische" Wirkung besaßen. Die oben erwähnten Arbeiten von Prof. Kritschewsky und unsere gemeinschaftliche Untersuchung des pathologisch-anatomischen Bildes bei der Anaphylaxie haben mir die Wahl erleichtert — ich hatte nur unter solchen Prozessen zu wählen, bei denen der Dispersionsgrad der Kolloide im Organismus gestört wird. Ich habe meine Untersuchung absichtlich auf primärtoxische Sera, Normalsera und verschiedene Immunsera, Organextrakte, aktive und passive Serum- und zelluläre Anaphylaxie, Anaphylatoxin, Peptone und Vergiftung mit artfremden Erythrozyten beschränkt, ohne mich mit pflanzlichen, tierischen und mineralischen Giften zu befassen, da ich hier nur die Wirkung von Eiweißstoffen und ihren Derivaten untersuchen wollte; ich muß jedoch erwähnen, daß ein ganz ähnliches Resultat durch die Einführung des Saftes von Cotyledon Scheideckeri, von Salvarsan und von anderen Stoffen erhalten werden kann, was aus den Arbeiten von Prof. Kritschewsky[3]) und aus unserer gemeinschaftlichen Untersuchung[4]) zu ersehen ist.

Bei meinen Versuchen starben die Meerschweinchen und Kaninchen nach einmaliger intravenöser Injektion von manchen normalen Tierseren, z. B. Katzenserum. Kaninchen gingen zuweilen auch nach einmaliger intravenöser Injektion von Hühnererythrozyten ein. Meerschweinchen habe ich ebenfalls hämolytisches Antihammelerythrozytenserum intravenös injiziert.

Meerschweinchen und Kaninchen erhielten intravenös emulgiertes Nierengewebe derselben Tierart.

1) Hulot et Ramond, Compt. Rend. Soc. Biol. 1901.
2) Marassini, Biochem. Centralbl.
3) Kritschewsky, loco cit.
4) Kritschewsky u. Friede, loco cit.

Meerschweinchen und Kaninchen starben an Serumanaphylaxie, wenn sie mit Pferdeserum sensibilisiert waren (aktive Anaphylaxie bei Meerschweinchen und Kaninchen, passive Anaphylaxie bei Meerschweinchen).

Aktive und passive zelluläre Anaphylaxie habe ich bei Kaninchen durch Immunisierung mit Hammelerythrozyten erhalten.

Schließlich habe ich Meerschweinchen Peptonum Witte und Anaphylotoxin iv. injiziert, das durch Bebrütung eines komplementhaltigen Serums mit Vibrio Metschnikoff erhalten wurde.

Die Protokolle zeigen eine vollkommene Identität des klinischen Bildes mit Ausnahme einiger geringer individueller Abweichungen. Einige Minuten nach der Einführung des Materials fielen die Versuchstiere auf die Seite (manchmal geschah dies nach einer kurzen Erregungsperiode) unter Erscheinungen von Dyspnoe, tonischen und klonischen Krämpfen, krampfhaftem Luftschlucken, Exophthalmus, unwillkürlichem Abgang von Urin und Fäzes; der Tod trat entweder während dieser Erscheinungen ein oder nach Ablauf der Krämpfe, wenn die Tiere sich in einem komatösen Zustande befanden und nur von Zeit zu Zeit krampfhaft atmeten. Der Zeitraum zwischen Injektion und Tod betrug 2 Min. bis 24 Std.

Die Obduktion geschah unmittelbar nach dem Tode (die Leiche war meistens noch warm), die Organe wurden in 10proz. Formollösung oder in Orthscher Lösung fixiert und in Zelloidin eingebettet. Die Färbung der Schnitte erfolgte mit Delafieldschem Hämatoxylin und mit Eosin. Das Zentralnervensystem wurde mit wässeriger Thioninlösung gefärbt. Die in den Organen konstatierten makro- oder mikroskopischen Veränderungen waren bei allen Versuchstieren, unabhängig von der Aetiologie der Prozesse, identisch; ich kann sie daher bei der Beschreibung summieren. Ich werde mich etwas länger bei der Beschreibung jener Organe aufhalten, deren durch die Wirkung von zytotoxischen Sera verursachte Veränderungen bereits von verschiedenen Autoren untersucht worden sind.

Bei der Sektion konnte bei manchen Versuchstieren eine durch Emphysem oder durch Oedem verursachte Vergrößerung des Lungenvolumens beobachtet werden; infolgedessen war das Herz fast gänzlich von den Lungen bedeckt (Phänomen von Auer-Lewis bei Anaphylaxie). Die Lungen erschienen an der Oberfläche hellrosa, manchmal bunt infolge punktförmiger oder auch größerer Blutungen.

Im Herzen fanden sich zuweilen Thromben, häufiger in der rechten Hälfte des Herzens. Der Herzmuskel sah zumeist normal aus. Die Leber war stets zyanotisch, die Nieren anämisch oder hyperämisch, oft war die Grenze zwischen kortikaler und medullarer Substanz fast nicht zu unterscheiden. In vielen Fällen bestand eine parenchymatöse Degeneration. Die Gefäße des Magens, des Darmes und des Zentralnervensystems waren fast immer hyperämisch. In der Schleimhaut des Magens und des Darms waren oft punktartige Blutungen zu sehen.

Das mikroskopische Bild war mit geringen Variationen ebenfalls bei allen Prozessen nahezu identisch. In allen Organen bestand fast regelmäßig Hyperämie, öfters waren auch Blutungen zu sehen. Diese beiden Erscheinungen sind fast stets in Herz, Nieren, Leber, Großhirn, verlängertem Mark, Rückenmark, Nebennieren, zuweilen im Darm, Magen und Diaphragma konstatiert worden. Im Herzmuskel war oft ein Schwund der Querstreifung eingetreten. In Leber und Nieren bestand sehr häufig parenchymatöse Degeneration, die manchmal zur Ne-

krose geführt hatte. In den Zellen der Leber und Nieren war häufig der Kern nicht erkennbar, oder in manchen Fällen nur schwach gefärbt. Das Zellprotoplasma war körnig, trübe und sah wie koaguliert aus. Manche Präparate aus Leber und Nieren machten den Eindruck, als ob das Protoplasma geschmolzen wäre, von der Zelle nur ihre Haut geblieben sei, und der Kern wie in einem leeren Raum schwämme; manchmal waren in solchen Zellen einzelne Fragmente des Protoplasmas zu erkennen. Die Zellen der Leber und Nieren waren vakuolisiert. Das Epithel der Nierenkanälchen war öfters derart geschwollen, daß ein Lumen in ihnen nicht mehr zu entdecken war. Ebenso oft befanden sich in den Kanälchen koagulierte Eiweißmassen oder desquamierte Epithelzellen.

Sehr starke Veränderungen waren im Nervensystem eingetreten. Außer der schon erwähnten Hyperämie und den Blutungen waren scharf ausgedrückte Veränderungen an den Zellen zu konstatieren. Fast regelmäßig bestand in den Zellen Chromatolyse und Achromatose. Nur selten konnte ich den Zellen normale, gut konturierte Schollen der Nißlschen Substanz sehen. Bei der Thioninfärbung erschienen die Zellen entweder wie hellblaue, kaum gefärbte Schatten (Achromatose), oder nahmen eine so intensive blaue Färbung an, daß der Kern fast nicht zu erkennen war (völlige Chromatolyse). Stellenweise konnte eine unvollkommene Chromatolyse konstatiert werden, d. h. ein Teil der Nißlschen Substanz blieb gut konturiert, der andere Teil erschien aber schwach konturiert, als ob die Substanz geschmolzen sei.

Eine intensive Reaktion der Gliazellen konnte stets konstatiert werden; eine große Anzahl derselben hatte sich in der Umgebung der im Zustande von Achromatose oder Chromatolyse befindlichen Nervenzellen angesammelt. Zuweilen blieb der Prozeß in diesem Stadium stehen, in einigen Präparaten konnte aber eine echte Neurophagie beobachtet werden; die Elemente der Glia waren in die Zellen eingedrungen, öfters waren die letzteren unter den sie befallenden Neurophagen gänzlich verschwunden. Solche Erscheinungen konnten häufig im Rückenmark und verlängerten Hirn, manchmal auch im Großhirn beobachtet werden.

Beim Vergleich des klinischen Symptomenkomplexes, der sich bei meinen Versuchstieren entwickelte, mit dem, der nach den Berichten vieler Autoren bei der Einführung von neuro- und thyreotoxischen Seris eintritt, kann man sich von ihrer großen Aehnlichkeit überzeugen; ein prävalierendes und am häufigsten vorkommendes Symptom bilden die Krämpfe, sowohl bei den Tieren, welche die genannten Sera erhalten hatten, als auch bei meinen Versuchstieren, unabhängig von dem in ihrem Organismus sich abspielenden Prozeß.

Die pathologisch-histologischen Veränderungen sind überraschend ähnlich. Fast alle Verfasser berichten über Hyperämie und Blutungen in den durch zelluläre Gifte vergifteten Organen. (Mir erscheint dieser Umstand etwas unlogisch, da „Zytotoxine", wenn sie überhaupt existieren, schon ihrer Natur nach nur gegen die Zellen des entsprechenden Organes gerichtet sein können. Das Gefäßsystem soll intakt bleiben, weil ja die Gefäße in allen Organen immer aus denselben Zellen bestehen. In den Fällen, welche die Autoren beschrieben haben, müßte das Serum kraft irgendwelcher unbekannter Umstände eine allgemeine Wirkung auf Blutgefäße besitzen.)

Wir sehen, daß es bei Anaphylaxie und bei der Einführung von Normal- und Immunseren und von anderen Stoffen, die ich gewählt hatte,

in allen Organen injizierte Blutgefäße, welche mir in allen Präparaten auffielen, und Blutungen gab, letztere von punktartigen bis zu derart ausgedehnten, daß die Organe mit Blut überfüllt erschienen und in denselben mehr Erythrozyten als Zellen des entsprechenden Organs vorhanden waren.

Die im Nervensystem bei der Einführung neurotoxischer Sera entstehenden und von Choroschko, Armand-Delille, Pirone u. a. beschriebenen Veränderungen (Achromatose, Chromatolyse, Neurophagie) habe ich ebenfalls bei meinen Untersuchungen von verschiedenen Prozessen wiederholt angetroffen.

Parenchymatöse Degeneration der Leberzellen, welche die Autoren durch eine spezifische Wirkung von Hepatotoxinen erklären, eine gleiche Degeneration des Nierenepithels, seine Schwellung, die zur Verstopfung des Lumens der Kanälchen führt, die Anwesenheit von Zylindern in den Kanälchen, alle diese Symptome, welche von den Autoren als Resultat der Wirkung von nephrotoxischen Seren auf das Nierengewebe angesehen werden, waren auch bei meinen Versuchstieren (Meerschweinchen und Kaninchen) stets vorhanden. Besonders bin ich auf die Vakuolisierung und auf das „Zerschmelzen“ des Protoplasmas in den Leber- und Nierenzellen und auf die Chromatolyse der Nervenzellen aufmerksam geworden; alle diese von mir wiederholt beobachteten Phänomene werden von mehreren Autoren als Wirkung spezifischer Zytolysine bezeichnet.

Die von mir in Herz und Nebennieren beobachteten Veränderungen gleichen denen, welche bei der Wirkung von Kardiotoxin oder Nebennierentoxin sich finden. Zwar habe ich solche Organe, wie Pankreas oder Gl. thyreoidea nicht untersucht, jedoch vermute ich, daß auch hier eine volle Analogie besteht. Da bei meinen Versuchen Nierenepithel oder Zellen der Leber usw. geschädigt wurden, kann ich nicht annehmen, daß die Gl. thyreoidea oder das Pankreas verschont bleiben.

Die elektive Wirkung der Zytotoxine auf das Organ, das zur Immunisierung gedient hat, stellt den wichtigsten Beweis ihrer Existenz dar. Allerdings ist eine derartige elektive Wirkung nicht in allen Fällen deutlich ausgesprochen. Einige Autoren haben bei der Einführung von spezifischen, gegen irgendein Organ gerichteten Seren nicht nur in dem entsprechenden Organ, sondern auch in anderen Organen Veränderungen antreffen können, die nicht minder stark ausgeprägt waren, als die Veränderungen in jenem Organe, welches als Antigen bei der Immunisierung gebraucht worden war. Diese Tatsache zeugt von einer biochemischen Verwandtschaft der Eiweißstoffe verschiedener Organe und beweist die Möglichkeit, durch Immunisierung mit dem Eiweißstoff irgendeines Organes die Bildung von Antikörpern gegen alle Organe desselben Tieres hervorzurufen.

Von allen, den Zytotoxinen gewidmeten Arbeiten muß die von Choroschko zuerst erwähnt werden, da es keine andere Arbeit gibt, in der die pathologisch-histologischen Veränderungen der Organe und zwar, was besonders wertvoll ist, aller Organe so ausführlich untersucht worden sind. Bemerkt sei, daß nur wenige Autoren eine pathologisch-anatomische Untersuchung irgendwelcher Organe, mit Ausnahme derjenigen, die das Objekt der Wirkung von spezifischen zytotoxischen Sera gewesen waren, vorgenommen haben.

Choroschko fand bei Tieren, die nach Injektion von heteroneurotoxischem Serum oder von emulgiertem Kaninchengehirn eingegangen waren, außer den bereits beschriebenen Veränderungen des Zentral-

nervensystems Hyperämie und Blutungen in verschiedenen Organen (Leber, Niere, Herz). Alle von Choroschko beschriebenen Veränderungen — Oedem der Herzmuskulatur, parenchymatöse Degeneration der Leber und Nieren, Zerfall und Zerschmelzen des Protoplasmas — stimmen vollkommen mit denen überein, die ich bei meinen Versuchstieren konstatiert habe. Manche Prozesse sind zwar von Choroschko häufiger als von mir beobachtet worden, zuweilen waren sie schärfer ausgedrückt, so ist z. B. die parenchymätöse Degeneration der Leber und Nieren weit schärfer ausgedrückt, der Herzmuskel erscheint manchmal bunt und färbt sich nur sehr schwach, auch besteht Zerfall des Sarkoplasmas; in mehreren Organen hat Choroschko eine rundzellige Infiltration konstatiert, die ich in vielen Fällen nicht habe beobachten können. Es ist auch möglich, daß alle erwähnten Prozesse nur ein weiteres Entwicklungsstadium der von mir beobachteten Veränderungen vorstellen und durch eine längere Lebensdauer der Tiere bei den Versuchen von Choroschko bedingt sind (weil in seinen Fällen der Autor nicht intravenös, sondern subkutan und intraperitoneal injiziert hat).

Bei meinen Versuchen war die Lebensdauer der Tiere nur nach Minuten zu zählen, während bei den Versuchstieren von Choroschko der Tod erst nach 24 Std. eintrat. Es ist denkbar, daß im ersteren Falle die Frist zu kurz war, um Veränderungen, wie z. B. die rundzellige Infiltration, die wahrscheinlich eine Reaktion des Organismus auf die Erkrankung (parenchymatöse Degeneration) der Zellen oder ihren Tod oder auf die Zerstörung der Gewebe durch Blutergüsse darstellt, entstehen zu lassen.

Die Zahl der Fälle, durch die gezeigt werden kann, daß die auf irgendein Organ toxisch wirkenden Sera gleichzeitig auch auf andere Organe wirken, ist sehr groß; ich begnüge mich, einige typische Fälle anzuführen.

Aus der oben erwähnten Arbeit von Marassini ersehen wir, daß nach Injektion von hepatoxischem Serum auch in der Niere nicht mindere, sondern vielmehr stärkere Veränderungen als in der Leber entstanden sind.

Nach Sartirana[1]) verursacht thyreotoxisches Serum krankhafte Erscheinungen im Zentralnervensystem bei Meerschweinchen; nach den Beobachtungen des Verfassers wirkt ein Antinebennierenserum stärker auf das Zentralnervensystem als auf Nebennieren. Woltmann[2]) berichtet, daß die nach Injektion verschiedener zytotoxischer Sera in den Organen entstehenden Veränderungen wenig untereinander differieren. Nach Sata[3]) treten nach Injektion von Zytotoxinen Zerfall von Erythrozyten, Veränderungen an den Gefäßwänden, Degeneration, Nekrose und Entzündungserscheinungen in parenchymatösen Organen ein. Höchst interessant erscheint die Tatsache, daß in Organen, die nicht als Antigen gebraucht worden sind, nicht nur in dem Falle Veränderungen entstehen, wenn das Tier mit emulgierten Organen immunisiert worden ist, sondern auch wenn aus den Organen gewonnene Nukleoproteide zur Immunisierung gedient haben [Bierry und Pettit, Marassini *)]. Dadurch wird der Einwand, daß in durchgespülten Organen Blut oder andere allen Organen angehörende Elemente, z. B. Zellen der Gefäßwände, anwesend seien, beseitigt.

Beim weiteren Studium der Literatur bin ich darauf aufmerksam geworden, daß, obwohl mehrere Autoren behaupten, spezifische Zytotoxine dargestellt zu haben, viele andere Autoren die Existenz von Zytotoxinen nicht anerkennen wollen und sich dabei auf die Anwesenheit verschiedener Veränderungen auch in anderen Organen und auf ihre negativen Versuche, Zytotoxine zu gewinnen, stützen.

1) Sartirana, Biochem. Centralbl.
2) Zitiert nach Fleischmann u. Dawidson, loco cit.
3) Sata, Zieglers Beitr. Bd. 39. 1906.
*) l. cit.

Ich werde hier nur einige Beispiele anführen. Das Serum von Hunden, die mit Kaninchengehirn immunisiert waren, zeigte sich unwirksam für Kaninchen (Rehns)[1]. Enriquez und Sicard[2]) haben bei ihren Versuchen, ein neurotoxisches Serum zu gewinnen, nur unbestimmte Resultate erhalten. Ravenna bezeichnet solches Serum als nicht spezifisch. Cridallo ist es nicht gelungen, Pankreotoxin zu gewinnen; Schütze, Albarrand und Bernard berichten über vergebliche Versuche, nephro- und hepatotoxische Sera herzustellen.

Es könnten noch viele Beispiele angeführt werden, jedoch genügen die oben angeführten. Es seien nur noch einige in vitro angestellte Versuche erwähnt, die der Frage der Spezifität der Zytotoxine gewidmet waren.

Michailoff[3]) hat durch Immunisierung von Kaninchen mit alkoholischem Extrakt aus Rattenzentralnervensystem Komplementablenkung erhalten, und zwar nicht nur mit Zentralnervensystem, sondern auch mit emulgierter Leber oder Niere.

Die Komplementbindung ist auch von Fleischmann und Dawidson angewandt worden. Die Autoren haben Kaninchen mit Mäuse- oder Meerschweinchenleber immunisiert und eine Komplementbindung durch verschiedene emulgierte Organe beobachtet, wobei es sich erwiesen hat, daß emulgierte Niere ebensogut das Komplement bindet, wie emulgierte Leber. Sie schließen hieraus, daß durch Immunisierung mit Organzellen organospezifische und streng artspezifische Antikörper nicht gewonnen werden können.

Die Arbeit von Schütze wird später erwähnt werden.

Nunmehr will ich noch einige Tatsachen erwähnen, welche gegen die Existenz von Zytotoxinen sprechen. Durch Immunisierung mit Kuhmilch erhält man ein Tierserum, das das Flimmerepithel der Rinder immobilisiert [v. Dungern [4])], und zwar in derselben Weise, wie es ein durch Immunisierung mit Flimmerepithel gewonnenes Serum zu tun vermag (biochemische Verwandtschaft der Eiweißstoffe).

Pearce[5]) hat hepato- und nephrotoxische Sera erhalten, indem er die Versuchstiere mit aus dem Pankreas erhaltener Nukleosäure immunisierte.

Der Umstand, daß manche Autoren durch die Einführung von Hepatotoxin, Thyreotoxin und sogar von Gastrotoxin (!) den Tod der Versuchstiere provoziert haben, erscheint ganz unerklärbar, wenn man annimmt, daß zytotoxische Sera nur auf das als Antigen gebrauchte Organ eine spezifische Wirkung haben. Der rasch eintretende Tod der Versuchstiere kann nicht durch das Ausbleiben der Funktion von solchen Organen, wie Leber, Gl. thyreoidea, Pankreas oder Magen (!) erklärt werden, da eine totale Exstirpation dieser Organe oder das Anlegen einer Ligatur um das zuführende Blutgefäß weit langsamer zum Tode führt.

Höchst überraschend erscheint mir der momentane Tod nach Einführung verschiedener Sera, z. B. von gastrotoxischem Serum! Es ist zweifellos, daß die Sera auf mehrere Organe wirken, deren Funktionsausbleiben den schnellen Tod der Versuchstiere verursacht.

Andererseits erscheint nicht minder überraschend der Umstand, daß nach Einführung von neurotoxischem Serum der Tod nicht sofort eintritt; wäre das Serum wirklich neurotoxisch, müßte seine Wirkung auf die lebenswichtigen Zentren der Medulla oblongata einen momentanen Tod verursachen.

Wenn man alles Gesagte resümiert, sieht man, daß die im Nervensystem eingetretenen und der spezifischen Wirkung von Neurotoxinen

1) Rehns, Compt. Rend. Soc. Biol. 1904.
2) Zitiert nach Michailoff, Fol. Serolog. Bd. 4. 1910.
3) Michailoff, Folia Serolog. Bd. 4. 1910.
4) Zitiert nach Fleischmann u. Dawidson.
5) Zitiert nach Fleischmann u. Dawidson, Folia Serolog. Bd. 1. 1908.

zugeschriebenen Veränderungen auch in einer anderen Weise verursacht sein können, nämlich durch die Einführung von Normal- oder Immunseren, d. h. von Stoffen, die keine spezifische oder elektive Wirkung auf das gegebene Organ besitzen, aber fähig sind, die Organismuskolloide durch Störung ihres Dispersionsgrades aus dem Gleichgewichtszustand zu bringen. Durch die Einführung solcher Stoffe können ebenso „spezifische" Veränderungen in der Niere, wie die bei der Einführung von nephrotoxischem Serum entstandenen, verursacht werden. Mittels solcher nicht „zytotoxischen" Sera habe ich eben solche Veränderungen in der Leber verursacht, wie die, welche bisher als spezifische für die Wirkung von Hepatotoxin betrachtet wurden, usw.

Andererseits, wenn wir das Tier „A" mit irgendeinem Organ des Tieres „B" immunisieren, so können wir eine toxische Wirkung des Serum „A" nicht allein auf das als Antigen benutzte Organ, sondern auf alle Organe des Tieres „B" feststellen.

Es ist anzunehmen, daß bei der Immunisierung mit dem Gewebe irgendeines Organes oder sogar mit Nukleoproteiden aus diesem Organ, das Versuchstier gegen die Eiweißstoffe des Tierorganismus im allgemeinen, welchem das Organ angehörte, immunisiert wird, wobei die Toxizität des Serums für den das Antigen liefernden Tierorganismus steigt und durch eine Steigerung seiner physikalisch-chemischen Aktivität (die Fähigkeit, den Dispersionsgrad der Organismuskolloide zu verändern) ausgedrückt wird.

Alle Autoren, deren Arbeiten ich zitiert habe, haben also nicht mit spezifischen „zytotoxsichen" Seren, sondern mit Immunseren experimentiert.

Ich muß nochmals auf eine Tatsache von großer Wichtigkeit hinweisen, nämlich darauf, daß es weder mittels Präzipitation, noch mittels der weit sensibleren Komplementablenkungsreaktion gelingt, die verschiedenen Organe eines Tieres untereinander zu differenzieren.

So hat Schütze[1]), indem er Hunde mit der Gl. thyreoidea eines Hammels immunisierte, Komplementablenkung sowohl mit einem Extrakt aus Gl. thyreoidea, als auch mit Extrakten aus Nieren, Nebennieren, Hoden, Epididymis, Milz und Pankreas erhalten. Man kann vermuten, daß, wenn die verschiedenen Organe eines Tieres keine verschiedenen Antigene vorstellen, sie auch keine Bildung von spezifischen, gegen sie allein gerichteten Antikörper verursachen können, und daß, infolge der biochemischen Verwandtschaft zwischen den Eiweißstoffen der verschiedenen Organe eines Tieres, die Immunisierung mit irgendeinem Eiweißstoff dieses Tieres zugleich gegen alle Eiweißstoffe desselben Organismus immunisiert.

Die meisten Autoren sind der Ansicht, daß die Eiweißstoffe von verschiedenen Organen miteinander verwandt sind.

Würden die Zellen der genannten Organe streng spezifische Antigene vorstellen, wären die Eiweißstoffe der verschiedenen Organe untereinander streng differenziert, so müßte man vermuten, daß sie bei allen Tieren fast identisch sind, und daß die Immunisierung z. B. mit Hundenieren, eine Bildung von Antikörpern gegen die Niere von Kaninchen, Katze, Mensch usw., d. h. Präzipitation und Komplementablenkung in vitro und pathologisch-histologische Veränderungen in vivo in den Nieren jedes anderen Tieres verursachen müsse. In der Tat geschieht das nicht

---

1) Schütze, Ztschr. f. klin. Med. Bd. 65. 1908.

— es gibt nämlich eine Artspezifität, jedoch keine Organspezifität; nur die Linse besitzt in dieser Hinsicht ganz besondere Eigenschaften.

Aus allen hier angeführten Untersuchungen, den meinigen und denen anderer Autoren, ist es klar, daß in Leber, Niere und Zentralnervensystem pathologische Veränderungen öfter eintreten und schärfer ausgedrückt sind. Ich glaube, daß solche elektive Wirkung, die bei Neuro-, Nephro- und Hepatolysinen als eine spezifische betrachtet wurde, durch eine größere Labilität ihrer Kolloide, die Fähigkeit, auf physikalisch-chemische Einwirkungen zu reagieren, d. h. durch eine mindere Stabilität ihrer Dispersionssysteme, zu erklären sind.

Ich bin der Meinung, daß von allen untersuchten Zytotoxinen nur die Hämolysine und Spermatolysine, welche ihre Wirkung auch in vitro zeigen, einen reellen Begriff vorstellen.

Zwar haben hämolytische Sera auch eine neurotoxische Wirkung (Sartirana u. a.), jedoch bleibt ihre hämolytische Wirkung in vitro prävalierend.

Solch exklusiver Fall, wie die Existenz von zytotoxischen Seren gegen Erythrozyten und Spermatozoen kann meiner Meinung nach dadurch erklärt werden, daß die beiden Objekte höchst eigentümliche Zellen, Zellen sui generis, vorstellen. Unter allen Zellen des Organismus sind nur die Erythrozyten, die eine sehr selbständige Existenz haben, kernlose Zellen. Man kann vermuten, daß auch ihr Chemismus von dem der anderen Zellen differiert. Wir müssen uns der Tatsache erinnern, daß die Immunisierung mit Erythrozyten eines Meerschweinchens, dessen Organe ein heterogenetisches Antigen enthalten, keine Bildung von heterogenetischen Hämolysinen verursacht. Allem Anschein nach differieren die Erythrozyten auch in dieser Hinsicht von allen übrigen Zellen des Organismus.

Was die Spermatozoen anbetrifft, besitzt ihr Protoplasma scheinbar ganz besondere Eigenschaften; man darf nicht vergessen, daß die Spermatozoen vom Keimplasma stammen, das von dem Plasma der somatischen Organe differiert. Die Tatsache wird durch ein besonderes Verhalten der Spermatozoen gegenüber den Immunitätsphänomenen bestätigt. Ich muß noch darauf hinweisen, daß es Bruck gelungen ist, mittels Komplementablenkung Affenblut von den Spermatozoen zu differenzieren; Eiweißstoffe aller anderen Organe können, wie schon erwähnt worden, in dieser Weise nicht differenziert werden.

Schlußfolgerung.

1) Es gibt im Organismus keine Zytotoxine, welche auf die das Antigen vorstellenden Zellen wie die spezifischen Antikörper reagieren.

2) Von allen bisher in der Literatur beschriebenen spezifischen Zytotoxinen sind in Wirklichkeit nur die Hämolysine und Spermatolysine, deren Wirkung in vitro konstatiert werden kann, als echte Zellgifte anzusprechen.

3) Nach Einführung mancher Normal- oder Immunsera, Organextrakte, heterogenen Erythrozyten oder von Pepton in die Blutbahn der Versuchstiere, ebenso bei aktiver oder passiver Serumanaphylaxie oder zellulärer Anaphylaxie entstehen unabhängig von ihrer Aetiologie die gleichen Veränderungen in den Tierorganen, wie sie als

spezifische Wirkung „zytotoxischer“ Seren beschrieben worden sind. Das klinische Bild ist bei allen Prozessen durchaus identisch und ähnelt dem, das nach Einführung von zytotoxischen Seren entsteht.

4) Bei der Immunisierung eines Tieres „A“ mit Zellen von irgendeinem Organ eines Tieres „B“ entstehen Antikörper nicht gegen die Zellen desselben Organs, sondern gegen alle Eiweißstoffe des Tieres „B“, d. h. es findet eine Steigerung der physikalisch-chemischen Aktivität des Serums „A“ (seiner Fähigkeit, den Dispersionsgrad der Kolloide des Organismus „B“ zu zerstören) statt.

Ueber die Mannigfaltigkeit der heterogenetischen Antigene in der Tierzelle.

[Aus dem wissenschaftlichen Institut für mikrobiologische Untersuchungen an der Moskauer Medizinischen Hochschule (2. Staats-Universität) (Direktor: Prof. I. L. Kritschewsky).]

Von Dr. **K. A. Friede.**

Seit dem Jahre 1911, d. h. seit dem Erscheinen der ersten Arbeit von Forssman[1]), wurde nach und nach bekannt, daß einige Tiere außer dem artspezifischen Antigen noch ein heterogenetisches Antigen, das artspezifische Antigen des Hammels, in ihren Organen enthalten. Dieses Antigen wurde von diesem Verf. in den Organen des Meerschweinchens, der Katze und des Pferdes in allen Geweben, außer den Erythrozyten, festgestellt. Später haben andere Autoren dieses Antigen in den Organen des Hundes, der Schildkröte, der Kröte, des Huhnes, der Maus und in den Kiemen der Karpfen, des Hechtes und der Schleie [Doerr und Pick[2]), Amako[3]), Tsuneoka[4])] festgestellt. Alle diese Tiere wurden in die Gruppe des „Meerschweinchentypus“ vereinigt.

In den Organen von Menschen, Kaninchen, Stier, Ratte, Taube und Schwein wurde kein heterogenetisches Hammelantigen festgestellt, und diese Tiere (und wahrscheinlich noch eine Reihe von anderen) wurden in eine andere große Gruppe, die Gruppe des „Kaninchentypus“ vereinigt. Doerr und Pick[5]) zeigten ferner, daß es die Nukleoproteide sind, die antigene Eigenschaften besitzen. Diese beiden Forscher formulierten ein Gesetz, wonach ein umgekehrtes Verhältnis zwischen den Organen und den Erythrozyten in bezug auf den Gehalt von heterogenetischem Antigen besteht. Ist ein heterogenetisches Antigen in den Organen eines bestimmten Tieres enthalten, so ist dasselbe Antigen in den Erythrozyten desselben Tieres nicht vorhanden und umgekehrt (wird ein Kaninchen mit den Erythrozyten des Pferdes oder des Meerschweinchens immunisiert, so entsteht kein heterogenetisches Hammelhämolysin).

---

1) Forssman, Biochem. Ztschr. Bd. 37. 1911.
2) Doerr u. Pick, Ztschr. f. Immunitätsf. Bd. 19. 1913, und Biochem. Ztschr. Bd. 60. 1914.
3) Amako, Ibid. Bd. 22. 1914.
4) Tsuneoka, Ibid. Bd. 22. 1914.
5) Doerr u. Pick, Biochem. Ztschr. Bd. 60. 1914.

Da das heterogenetische Hammelantigen an Nukleoproteide und folglich an Zellkerne gebunden ist, so glaubte Kritschewsky[1]) annehmen zu dürfen, daß das Fehlen des heterogenetischen Hammelantigens in den Erythrozyten der Tiere des Meerschweinchentypus durch die Abwesenheit von Kernen in den Erythrozyten dieser Tiere zu erklären sei. Aus diesem Grunde immunisierte Kritschewsky Kaninchen mit kernhaltigen Erythrozyten des Huhnes. Dieser Versuch führte zur Entdeckung des heterogenetischen Hammelantigens in den Hühnererythrozyten.

Kritschewsky war der erste, der gezeigt hat, daß außer dem schon früher durch Forssman[2]) entdeckten heterogenetischen Hammelantigen noch andere biochemische Komplexe — andere heterogenetische Antigene — existieren. Ein zweiter biochemischer Komplex, das heterogenetische Antigen des Huhnes, wurde von Kritschewsky in den Erythrozyten des Hammels und in den Nieren des Pferdes festgestellt. Wurden Kaninchen mit Hammelerythrozyten oder mit der Niere des Pferdes immunisiert, so enthielt das Serum dieser Kaninchen Hämolysine für Hühnererythrozyten. Die Arbeiten von I. L. Kritschewsky haben mein Interesse auf diese Fragen gelenkt. Seinem Vorschlag folgend, habe ich diese Fragen weiter verfolgt und so ist die vorliegende Arbeit entstanden.

Ich habe mir zur Aufgabe gestellt, zu erforschen, ob das heterogenetische Hammelantigen noch in anderen kernhaltigen Erythrozyten außer denen des Huhnes enthalten ist. Außerdem wollte ich die Frage lösen, ob in den Hammelerythrozyten und den Organen der Tiere des Meerschweinchentypus noch andere heterogenetische biochemische Komplexe, heterogenetische Antigene, enthalten sind.

Als Versuchsobjekt habe ich die Schildkröte gewählt, und zwar aus folgenden Gründen: 1) sie besitzt kernhaltige Erythrozyten, 2) sie enthält ein für die Arbeit genügendes Blutquantum und besitzt 3) (voraussichtlich) in ihren Organen das heterogenetische Hammelantigen. [Aus den Versuchen von I. L. Kritschewsky[3]) mit Hühnererythrozyten geht hervor, daß das Gesetz von Doerr und Pick[4]) über das umgekehrte Verhältnis zwischen den Organen und den Erythrozyten in bezug auf den Gehalt an heterogenetischen Antigenen sich als unrichtig erwiesen hat: sowohl die Organe als auch die Erythrozyten des Huhnes enthalten heterogenetisches Hammelantigen.]

Es gelang mir, einige Land-Schildkröten (Testudo graeca) zu bekommen. Mit Schildkröten hat schon früher Amako[5]) gearbeitet, doch gibt er in seiner Arbeit keine nähere zoologische Bezeichnung der Art. Es besteht daher die Möglichkeit, daß Amako mit japanischen Schildkröten gearbeitet hat, weshalb es nicht als feststehend angesehen werden konnte, ob Testudo graeca auch in seinen Organen das heterogenetische Hammelantigen enthält. Bekanntlich können unter sehr nahe verwandten Tierarten einige derselben dieses Antigen in ihren Organen enthalten, die anderen aber nicht, z. B. Huhn und Taube, Stier und Hammel, Frosch und Kröte.

---

1) Kritschewsky, The Journ. of experim. Medic. Vol. 24. 1916, und Medic. Obosren. 1917. No. 13—16.
2) Forssman, loco cit.
3) Kritschewsky, loco cit.
4) Doerr u. Pick, loco cit.
5) Amako, loco cit.

Man konnte zwar diese Frage sehr leicht durch die Immunisierung von Kaninchen mit den Organen von Testudo graeca lösen. Wenn bei diesem Verfahren das heterogenetische Hammelhämolysin produziert wird, so muß die Frage der Anwesenheit des heterogenetischen Hammelantigens in den Organen von Testudo graeca positiv beantwortet werden. Doch konnten solche Versuche bei uns nicht vorgenommen werden, da Testudo graeca ein zu teures und seltenes Objekt ist. Daher mußte diese Frage auf Umwegen gelöst werden.

Kritschewsky[1]) hat folgende Wechselbeziehungen zwischen heterogenetischen Antigenen beobachtet: wenn Hühnererythrozyten das heterogenetische Hammelantigen enthalten, so enthalten auch Hammelerythrozyten das heterogenetische Hühnerantigen.

Auf die Beobachtungen von Kritschewsky gestützt, untersuchte ich, ob die Hämolyse der Schildkrötenerythrozyten durch das gewöhnliche käufliche hämolytische Antihammelserum hervorgerufen wird.

Vorläufige Versuche zeigten, daß normales Kaninchenserum (es wurden Proben von verschiedenen Kaninchen genommen) niemals eine Hämolyse der Schildkrötenerythrozyten bei einer Verdünnung 1:100 hervorruft (1:100 ist die Verdünnung, von der ich gewöhnlich bei meinen Versuchen ausging).

Für den Orientierungsversuch wurden 2 hämolytische Sera genommen: ein Serum wurde in dem Institut, vormals Blumenthal (Titer 1:1000) gewonnen, das andere Serum wurde mir aus dem Institut Metschnikow (Tit. 1:2400) durch Dr. O. G. Birger übergeben.

Der Versuch wurde, wie auch im weiteren, bei einem Gesamtvolumen von 0,75 ccm ausgeführt (0,25 ccm des Serums in Verdünnungen von 1:100 bis 1:1000 + 0,25 ccm des Komplements 1:10 + 0,25 ccm der Erythrozytenaufschwemmung). Jedesmal wurden 3 Kontrollversuche ausgeführt: für sich allein wurden die Erythrozyten, das Serum und das Komplement kontrolliert. Der Versuch wurde nach 2stündigem Stehen im Brutschrank abgelesen.

Die Beurteilung des Grades der Hämolyse von kernhaltigen Erythrozyten muß, wie I. L. Kritschewsky[1]) in seiner Arbeit bemerkt, etwas anders ausgeführt werden, als man es beim Arbeiten mit kernlosen Erythrozyten zu tun pflegt. Bei der Hämolyse der kernhaltigen Erythrozyten tritt keine vollständige Klärung der Flüssigkeit ein, auch verschwindet der Niederschlag hier sogar bei kompletter Hämolyse nicht, weil die ausgelaugten Erythrozyten Kerne enthalten. Der Versuch wurde in spitzen Uhlenhuth-Röhrchen ausgeführt. Nach dem Abschluß des Versuches werden die Röhrchen zentrifugiert. Bei kompletter Hämolyse ist die Flüssigkeitssäule stark gefärbt, der Niederschlag aus ausgelaugten Erythrozyten hat eine weiße Farbe. Bei partieller Hämolyse ist die Flüssigkeitssäule ebenfalls intensiv gefärbt, der Niederschlag besteht aus 2 scharf voneinander getrennten Schichten, deren untere rot ist und aus unbeschädigten Erythrozyten besteht, während die obere Schicht weiß ist und aus Erythrozytenschatten besteht.

Also kann die Intensität der Hämolyse nach 1) der Intensität der Flüssigkeitsfarbe und 2) nach der Dicke der weißen Schicht von Erythrozytenschatten sowie nach der An- oder Abwesenheit von unbeschädigten Erythrozyten beurteilt werden.

1) Kritschewsky, loco cit.

Ich nahm an, daß in den Röhrchen eine komplette Hämolyse stattgefunden hatte, in denen der ganze Niederschlag aus einer einzigen weißen Schicht bestand; diese Röhrchen bezeichnete ich mit k. H.; die Röhrchen, in welchen die weiße Schicht dicker als die rote war, mit f. k. H. (fast komplette Hämolyse). Ist die weiße Schicht in den Röhrchen dünner oder ebenso dick wie die rote, so wurden solche Röhrchen mit p. H. — partielle Hämolyse — bezeichnet und endlich die Röhrchen mit Sp. H. — Spur von Hämolyse —, in welchen die weiße Schicht äußerst dünn und die Flüssigkeit nur schwach gefärbt war. Im Protokoll ist vermerkt, daß keine Hämolyse (0) stattgefunden hat, wenn die Flüssigkeit ungefärbt ist und wenn die weiße Schicht fehlt.

Als ich Versuche mit einem mir zur Verfügung gestellten Serum unternahm, erfolgte die Hämolyse der Schildkröteneryrthrozyten bis zur Verdünnung 1:500; in dieser Verdünnung war die weiße Schicht schon kaum merklich. Wurde das andere Serum genommen, so gelang die Hämolyse bis zur Verdünnung 1:700. Doch trat bei keiner Verdünnung weder komplette Hämolyse noch fast komplette Hämolyse ein (Tab. 1).

Tabelle 1.

Hämolyse von Schildkröteneryrthrozyten mit hämolytischem Antihammelserum in physiologischer Kochsalzlösung mit 0,85proz. NaCl.

Verdünnungen des Serums	Serum aus Institut Metschnikow	Serum aus Institut Blumenthal	Bemerkung
1:100	p. H.	p. H.	k. H. = komplette Hämolyse
1:200	0	dgl.	f. k. H. = fast komplette Hämolyse
1:300	p. H.	"	p. H. = partielle Hämolyse
1:400	p. H.	"	Sp. H. = Spur von Hämolyse
1:500	Sp. H.	Sp. H.	0 = keine Hämolyse
1:700	Sp. H.	0	3 K. = 3 Kontrollen (Kontrolle der Erythro-
1:900	0	0	zyten, des Serums und des Komplements
1:1000	0	0	als solchen)
3 K.	0	0	

Tabelle 2.

Immunisierung der Kaninchen mit Hammelerythrozyten.

Verdünnungen des Serums	A. Der Gehalt des Serums an Hämolysinen für Erythrozyten von									
	Hammel				Huhn		Schildkröte			
	Nr. der Tiere 106	Nr. der Tiere 379	Serum aus Inst. Blument.	Serum aus Inst. Metsch.	Nr. der Tiere 106	Nr. der Tiere 374	Nr. der Tiere 106	Nr. der Tiere 374	Serum aus Inst. Blument.	Serum aus Inst. Metschn.
1:100	k. H.	k. H.	k. H.	k. H.	f. k. H.	.	f. k. H.	f. k. H.	f. k. H.	f. k. H.
1:200	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.	.	p. H.	p. H.	dgl.	dgl.
1:300	"	"	"	"	"	.	dgl.	dgl.	"	"
1:400	"	"	"	"	"	.	"	"	p. H.	p. H.
1:500	"	"	"	"	p. H.	.	Sp. H.	Sp. H.	dgl.	dgl.
1:700	"	"	"	"	dgl.	.	0	0	"	"
1:900	"	"	"	"	"	.	0	0	"	Sp. H.
1:1000	"	"	"	"	"	.	0	0	Sp. H.	Sp. H.
3 K.	0	0	0	0	0	.	0	0	0	0
	B. Der Gehalt des Serums an Hämagglutininen									
1:100	+	+	+	+	.	.	—	—	—	—
1:200	+	+	+	+	.	.	—	—	—	—
1:300	+	+	+	+	.	.	—	—	—	—
1:400	+	+	+	+	.	.	—	—	—	—
1:500	+	+	+	+	.	.	—	—	—	—
K.	—	—	—	—	.	.	—	—	—	—

Bemerk.: + = Anwesenheit d. Hämagglut., — = Abwesenheit d. Hämagglut.

Alle für diese Versuche genommenen Ingredienzien wurden durch Verdünnung mit gewöhnlicher physiol. Kochsalzlösung, die 0,85 Proz. NaCl enthielt, bereitet. Man mußte aber berücksichtigen, daß für Kaltblüter eine physiol. Kochsalzlösung isotonisch ist, die nur 0,6 Proz. NaCl enthält; eine Lösung, die 0,85 Proz. NaCl enthält, ist für Schildkrötenerythrozyten hypertonisch, ruft eine Schrumpfung derselben hervor und kann die Hämolyse hemmen. Als ich nun für meine Versuche eine physiol. Kochsalzlösung mit dem Gehalt von 0,6 Proz. nahm, erfolgte die Hämolyse noch bei Verdünnung 1:1000; bei dieser Verdünnung war sogar die weiße Schicht zu bemerken (Tab. 2). Bei Verdünnungen 1:100 und 1:200 bildete die weiße Schicht $^3/_4$ des Niederschlages, die rote Schicht entsprach $^1/_4$ desselben; wir hatten hier also fast komplette Hämolyse. Im weiteren wurden alle Versuche mit Schildkrötenerythrozyten unter Verwendung von 0,6proz. Kochsalzlösung ausgeführt; diese Lösung wurde sowohl für die Verdünnung aller Ingredienzien als auch für die Auswaschung der Schildkrötenerythrozyten verwendet.

Aus den Protokollen ist zu ersehen, daß normales Kaninchenserum niemals eine Hämolyse der Schildkrötenerythrozyten bei einer Verdünnung 1:100 herbeiführt (Tabelle 3); das hämolytische Anti-

Tabelle 3.
Normalkaninchensera.

Verdünnungen des Serums	Der Gehalt an Hämolysinen für Erythrozyten von											
	Hammel				Huhn				Schildkröte			
	Nr. der Tiere				Nr. der Tiere				Nr. der Tiere			
	201	208	224	248	201	208	224	248	201	208	224	248
1:100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1:200	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
1:300	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
1:400	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
1:500	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
3 K.	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"

hammelserum bewirkte hingegen bei Verdünnung 1:100 und 1:200 eine fast komplette Hämolyse, bei Verdünnung bis 1:900 eine partielle Hämolyse und endlich bei Verdünnung 1:1000 Spuren der Hämolyse. Infolgedessen muß angenommen werden, daß das hämolytische Antihammelserum das heterogenetische Schildkrötenhämolysin enthält, folglich enthalten auch die Hammelerythrozyten das heterogenetische Schildkrötenantigen.

Durch diese Versuche wurde die Existenz eines 3. biochemischen Komplexes, der verschiedenen Tieren eigen ist, die Existenz des heterogenetischen Schildkrötenantigens festgestellt. Diese Versuche erforderten aber eine weitere Nachprüfung, was auch im weiteren ausgeführt wurde. Von Anfang an wurden Versuche, die die Frage über die Existenz des heterogenetischen Hammelantigens in den Erythrozyten von Testudo graeca aufklären mußten, unternommen. Auf die Versuche von I. L. Kritschewsky[1]) gestützt, konnte man annehmen, daß, wenn die Hammelerythrozyten das heterogenetische Schildkrötenantigen enthalten, auch in den Schildkrötenerythrozyten das heterogenetische Hammelantigen vorhanden ist. Es erwies sich wirklich, daß in den Ery-

1) Kritschewsky, loco cit.

throzyten von Testudo graeca, ganz analog den Befunden beim Huhn, das heterogenetische Hammelantigen enthalten ist. Bei der Immunisation von Kaninchen mit Schildkrötenerythrozyten rief das so erhaltene Kaninchenserum die Hämolyse von Hammelerythrozyten hervor.

Die Immunisation wurde mit 3mal abgewaschenen Schildkrötenerythrozyten, die zur Hälfte mit physiol. Lösung verdünnt wurden, vorgenommen. Die Injektion von Erythrozyten wurde 2mal mit wöchentlicher Unterbrechung durchgeführt. Für die erste Injektion wurden 0,5 ccm Erythrozyten, für die zweite 1 ccm verwendet. Die erste Injektion erfolgte in die Ohrvene, die zweite intraperitoneal. Die Hämolyse wurde, wie oben beschrieben, in Volumen von 0,75 ccm vorgenommen. War das Resultat befriedigend (die Stärke des Serums wurde nach seinem Titer in bezug zu Hammelerythrozyten gemessen), so wurde das Kaninchen steril durch die Arteria carotis entblutet; das Serum wurde z. T. flüssig aufbewahrt, z. T. wurde es im Apparat von Faust-Heim eingetrocknet. Falls der Titer ungenügend war, wurde eine dritte Injektion vorgenommen, doch führte gewöhnlich diese zu keinem Resultat, da der Titer dadurch nicht gesteigert werden konnte.

Dabei muß folgende interessante Tatsache hervorgehoben werden: Der Titer solcher Sera schwankte bezüglich der Hammelerythrozyten zwischen 1:500 und 1:1000; dagegen war der Titer derselben Sera bezüglich der Schildkrötenerythrozyten viel niedriger (Tab. 4), es trat bei keiner Verdünnung eine komplette Hämolyse ein (1:100 f. k. H. und

Tabelle 4.
Immunisierung der Kaninchen mit Schildkrötenerythrozyten.

Verdünnungen des Serums	A. Der Gehalt des Serums an Hämolysinen für Erythrozyten von											
	Hammel				Huhn				Schildkröte			
	Nr. der Tiere				Nr. der Tiere				Nr. der Tiere			
	591	592	593	544	591	592	593	544	591	592	593	544
1:100	p. H.	p. H.	k. H.	k. H.	k. H.	k. H.	k. H.	k. H.	f. k. H.	f. k. H.	f. k. H.	f. k. H.
1:200	p. H.	k. H.	dgl.	dgl.	f. k. H.	f. k. H.	f. k. H.	p. H.	p. H.	p. H.	p. H.	f. k. H.
1:300	k. H.	dgl.	„	„	dgl.	dgl.	dgl.	p. H.	dgl.	dgl.	dgl.	p. H.
1:400	dgl.	„	„	„	„	„	„	Sp. H.	„	„	„	dgl.
1:500	„	„	„	f. k. H.	„	„	„	dgl.	„	„	„	„
1:700	f. k. H.	„	f. k. H.	dgl.	„	„	p. H.	„	„	„	Sp. H.	Sp. H.
1:900	dgl.	„	p. H.	„	„	„	p. H.	„	„	Sp. H.	Sp. H.	0
1:1000	„	f. k. H.	p. H.	p. H.	„	„	Sp. H.	„	Sp. H.	Sp. H.	0	0
3 K.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	B. Der Gehalt des Serums an Hämagglutininen.											
1:100	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
1:200	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
1:300	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
1:400	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
1:500	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
K.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

bis 1:700 p. H.). Eine solche Tatsache — größerer Gehalt des heterogenetischen Hämolysins im Vergleich zum Gehalt des homologen — wurde früher von Forssman beobachtet.

Es muß aber bemerkt werden, daß Schildkrötenerythrozyten auch bei Anwendung von anderen hämolytischen Reagentien schwerer als die Hammelerythrozyten hämolysiert werden; so werden die letzteren bei einer Zugabe von destilliertem Wasser oder von Saponin 1:50 fast

momentan aufgelöst, demgegenüber tritt eine komplette Hämolyse von Schildkrötenerythrozyten nach der Beigabe dieser Reagentien nur nach $^1/_2$—2stünd. Verweilen im Brutschrank ein. Außerdem muß berücksichtigt werden, daß wir es hier mit mehreren unbekannten Faktoren zu tun haben. Es kann sein, daß das Komplement eines Warmblüters (wir arbeiteten wie gewöhnlich mit dem Komplement des Meerschweinchens) sich nicht ganz für die Arbeiten mit Erythrozyten eines Kaltblüters eignet. (Nach Amako besitzt der hämolytische Ambozeptor des Schildkrötenserums keine passenden Rezeptoren für das Komplement des Meerschweinchens. Nach Doerr und Pick vermag das Komplement des Huhns nicht das inaktivierte Kaninchenserum zu reaktivieren.) Es kann ferner angenommen werden, daß die Konzentration der physiologischen Lösung (0,6proz.) für das Serum und das Komplement der Warmblüter unpassend ist; dieser Umstand vermag hier auch eine Rolle zu spielen. Es kann sein, daß der niedrige Titer gegenüber Schildkrötenerythrozyten durch alle diese Faktoren bedingt wird. Ich will gleich hier bemerken, daß auch in allen anderen Versuchen der Titer der verschiedenen Sera fast immer gegenüber Schildkrötenerythrozyten etwas niedriger war als gegenüber anderen Erythrozytenarten.

Nachdem nun die Anwesenheit des heterogenetischen Hammelantigens in den Schildkrötenerythrozyten und die Anwesenheit des heterogenetischen Schildkrötenantigens in den Hammelerythrozyten festgestellt war (Kontrollversuche mit der Immunisierung von Kaninchen mit Hammelerythrozyten, von denen oben die Rede war, haben diese letzte Tatsache bestätigt, siehe Protokolle), mußte ganz natürlich das Schildkrötenantigen in den Hühnererythrozyten, und das Hühnerantigen in den Schildkrötenerythrozyten gesucht werden.

Bei der Immunisierung von Kaninchen mit Schildkrötenerythrozyten werden heterogenetische Hämolysine in bezug zu Hühnererythrozyten gebildet. Das normale Kaninchenserum ruft niemals, wie Orientierungsversuche gezeigt haben, Hämolyse der Hühnererythrozyten bei einer Verdünnung 1:100 hervor (auch nach Kritschewsky kann das normale Kaninchenserum in einer Dosis: 0,02 und 0,01 niemals Spuren einer Hämolyse von Hühnererythrozyten hervorrufen). Wird aber das Serum von Kaninchen, die mit Schildkrötenerythrozyten immunisiert waren, genommen, so entsteht eine komplette Hämolyse von Hühnererythrozyten bei einer Verdünnung 1:100 und eine fast komplette Hämolyse bei weiterer Verdünnung bis 1:1000. [Es muß hier wieder die schon früher erwähnte Tatsache angeführt werden, daß der Titer gegenüber homologen (Schildkröten-)Erythrozyten hier niedriger als gegenüber den Hühnererythrozyten war: eine fast komplette Hämolyse der Schildkrötenerythrozyten wurde nur bei der Verdünnung 1:100 vermerkt, partielle Hämolyse findet statt bei einer Verdünnung bis 1:700. Komplette Hämolyse wurde nicht beobachtet.] (Tabelle 4.)

Auf Grund dieser Versuche kann behauptet werden, daß Schildkrötenerythrozyten das heterogenetische Hühnerantigen enthalten, es kann auch angenommen werden, daß in Hühnererythrozyten das heterogenetische Schildkrötenantigen vorhanden ist.

Bei der Immunisierung von Kaninchen mit Hühnererythrozyten stellte sich heraus, daß heterogenetische Hämolysine für Schildkrötenerythrozyten nur in sehr geringen Mengen und nicht immer produziert werden. Das Serum mancher Kaninchen rief gar keine Hämolyse von Schildkrötenerythrozyten hervor (es ist zu bemerken, daß der Titer

solcher Sera auch für homologe [Hühner]-Erythrozyten und für Hammelerythrozyten niedrig war), andere Kaninchen lieferten ein Serum, welches bei einer Verdünnung 1:100 partielle Hämolyse hervorrief; bei einer Verdünnung bis 1:500 wurden Spuren einer Hämolyse beobachtet (Tabelle 5).

Tabelle 5.
Immunisierung der Kaninchen mit Hühnererythrozyten.

Verdünnungen des Serums	A. Der Gehalt des Serums an Hämolysinen für Erythrozyten von											
	Hammel				Huhn				Schildkröte			
	Nr. der Tiere				Nr. der Tiere				Nr. der Tiere			
	1	2	357	372 a	1	2	357	372 a	1	2	357	372 a
1:100	k. H.	p. H.	k. H.	f. k. H.	k. H.	k. H.	k. H.	f. k. H.	p. H	0	Sp. H.	0
1:200	dgl.	p. H.	f. k. H.	dgl.	dgl.	f. k. H.	f. k. H.	p. H.	dgl.	„	0	„
1:300	„	Sp. H.	dgl.	„	„	p. H.	dgl.	dgl.	„	„	„	„
1:400	„	„	„	p. H.	„	p. H.	„	„	Sp. H.	„	„	„
1:500	„	„	„	Sp. H.	„	0	p. H.	„	dgl.	„	„	„
1:700	f. k. H.	„	„	0	f. k. H.	0	dgl.	„	„	„	„	„
1:900	dgl.	„	p. H.	0	dgl.	0	„	„	0	„	„	„
1:1000	„	„	Sp. H.	0	„	0	„	„	0	„	„	„
3 K.	0	„	0	0	0	0	0	0	0	„	„	„
	B. Der Gehalt des Serums an Hämagglutininen.											
1:100	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—
1:200	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—
1:300	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—
1:400	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—
1:500	—	—	—	—	+	—	+	+	—	—	—	—
K.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Bei der Beurteilung dieser Ergebnisse müssen wir berücksichtigen, daß Schildkrötenerythrozyten eine große Stabilität sogar gegenüber homologen Sera besitzen und auch von physikalischen und chemischen hämolytischen Reagentien wenig angegriffen werden, andererseits kann das normale Kaninchenserum niemals eine Hämolyse von Schildkrötenerythrozyten bei einer Verdünnung 1:100 hervorrufen. Daher muß auf Grund dieser Versuche angenommen werden, daß Hühnererythrozyten zweifellos auch das heterogenetische Schildkrötenantigen enthalten, doch möglicherweise in nur geringen Mengen. Auch kann die schwache Hämolyse in diesen Versuchen davon abhängen, daß das Komplement für die Erythrozyten nicht paßt (auf dieses Moment wurde schon oben hingewiesen).

Meine weiteren Versuche waren der Frage über den Gehalt verschiedener heterogenetischer Antigene in den Organen verschiedener Tiere gewidmet. Es waren die Tiere des Meerschweinchentypus, die ich zuerst untersuchte.

Auf den Gehalt an heterogenetischem Hammelantigen wurden die Organe verschiedener Tiere von verschiedenen Autoren ziemlich eingehend geprüft[1]).

Was das Hühnerantigen betrifft, so ist in der Literatur nur eine Arbeit von I. L. Kritschewsky[2]) zu finden; der Verfasser hat das Hühnerantigen in den Nieren des Pferdes entdeckt.

1) Forssman, Doerr u. Pick, Amako, Tsuneoka, loco cit.
2) Kritschewsky, loco cit.

Ich habe Kaninchen mit der Niere des Pferdes, der Katze und des Meerschweinchens immunisiert und untersuchte das gewonnene Serum auf den Gehalt an Hammel-, Hühner- und Schildkrötenhämolysinen.

Die Nieren wurden mit einer Schere in kleine Stückchen zerkleinert, in einem Mörser mit physiologischer Kochsalzlösung zerrieben, durch feinen Mull durchgelassen und den Kaninchen i.p. injiziert; es wurden zwei Injektionen mit wöchentlicher Unterbrechung vorgenommen: 0,5 g der Organe wurden bei der ersten Injektion, und 1,0 g bei der zweiten eingeführt. Eine Woche nach der zweiten Injektion wurde eine Probe entnommen.

Das Serum von Kaninchen, welche mit der Katzenniere immunisiert waren, rief komplette Hämolyse von Hühnererythrozyten bis zur Verdünnung 1:200 hervor (partielle Hämolyse bis zur Verdünnung 1:700). Eine partielle Hämolyse von Schildkrötenerythrozyten konnte bis zur Verdünnung 1:300 beobachtet werden; bei weiterer Verdünnung wurden nur Spuren einer Hämolyse beobachtet (Tabelle 6).

Tabelle 6.
Immunisierung der Kaninchen mit Katzenniere.

Verdünnungen des Serums	A. Der Gehalt des Serums an Hämolysinen für Erythrozyten von											
	Hammel				Huhn				Schildkröte			
	Nr. der Tiere				Nr. der Tiere				Nr. der Tiere			
	462	463	475	476	462	463	475	476	462	463	475	476
1:100	f. k. H.	k. H.	k. H.	k. H.	k. H.	k. H.	k. H.	f. k. H.	p. H.	p. H.	p. H.	p. H.
1:200	k. H.	dgl.	dgl.	dgl.	f. k. H.	k. H.	k. H.	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.
1:300	f. k. H.	"	"	"	f. k. H.	f. k. H.	f. k. H.	"	"	"	"	"
1:400	p. H.	"	"	"	p. H.	p. H.	p. H.	"	Sp. H.	Sp. H.	Sp. H.	Sp. H.
1:500	dgl.	"	"	f. k. H.	dgl.	Sp. H.	dgl.	p. H.	Sp. H.	Sp. H.	0	dgl.
1:700	"	f. k. H.	f. k. H.	p. H.	"	Sp. H.	"	p. H.	0	0	0	"
1:900	"	p. H.	dgl.	Sp. H.	"	p. H.	Sp. H.	Sp. H.	0	0	0	0
1:1000	Sp. H.	0	"	0	Sp. H.	p. H.	0	0	0	0	0	0
3 K.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	B. Der Gehalt des Serums an Hämagglutininen.											
1:100	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1:200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1:300	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1:400	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1:500	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
K.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Also enthalten die Nieren der Katze außer dem heterogenetischen Hammelantigen auch das heterogenetische Hühner- und Schildkrötenantigene.

Die Immunisierung mit Pferdenieren führte zu analogen Resultaten. Die Hämolyse von Schildkrötenerythrozyten wurde bei einer Verdünnung 1:100 vorgenommen; weiter konnten nur Spuren der Hämolyse bemerkt werden (Tabelle 7, s. S. 163).

Obwohl die Hämolyse hier nur unbedeutend war, muß doch auf Grund der oben angeführten Erwägungen angenommen werden, daß in den Nieren des Pferdes außer dem Hammel- und Hühnerantigen auch das heterogenetische Schildkrötenantigen enthalten ist.

Bei der Immunisierung von Kaninchen mit der Niere des Meerschweinchens bewirkte das gewonnene Serum komplette Hämolyse der

Tabelle 7.

Immunisierung der Kaninchen mit Pferdeniere.

Verdünnungen des Serums	A. Der Gehalt des Serums an Hämolysinen für Erythrozyten von											
	Hammel				Huhn				Schildkröte			
	Nr. der Tiere				Nr. der Tiere				Nr. der Tiere			
	103 a	108	476 a	477	103 a	108	476 a	477	103 a	108	476 a	477
1:100	f. k. H.	k. H.	.	.	k. H.	k. H.	k. H.	k. H.	p. H.	p. H.	p. H.	Sp. H.
1:200	f. k. H.	dgl.	.	.	k. H.	f. k. H.	k. H.	p. H.	Sp. H.	Sp. H.	Sp. H.	dgl.
1:300	p. H.	„	.	.	f. k. H.	f. k. H.	f. k. H.	dgl.	dgl.	0	dgl.	„
1:400	dgl.	f. k. H.	.	.	dgl.	p. H.	dgl.	„	„	0	„	„
1:500	„	Sp. H.	.	.	„	p. H.	„	Sp. H.	„	0	0	0
1:700	Sp. H.	0	.	.	„	Sp. H.	p. H.	Sp. H	„	0	0	0
1:900	0	0	.	.	„	Sp. H.	Sp. H.	0	„	0	0	0
1:1000	0	0	.	.	„	0	0	0	„	0	0	0
3 K.	0	0	.	.	0	0	0	0	0	0	0	0
	B. Der Gehalt des Serums an Hämagglutininen.											
1:100	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1:200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1:300	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1:400	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1:500	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
K.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Hühnererythrozyten bis zur Verdünnung 1:1000. Die Hämolyse von Schildkrötenerythrozyten wurde auch bis zur Verdünnung 1:1000 beobachtet, doch trat eine komplette Hämolyse in keinem Fall ein; fast komplette Hämolyse wurde bei Verdünnungen bis 1:300 beobachtet (Tabelle 8).

Tabelle 8.

Immunisierung der Kaninchen mit Meerschweinchenniere.

Verdünnungen des Serums	A. Der Gehalt des Serums an Hämagglutininen für Erythrozyten von											
	Hammel				Huhn				Schildkröte			
	Nr. der Tiere				Nr. der Tiere				Nr. der Tiere			
	369	370	380	390	369	370	380	390	369	370	380	390
1:100	k. H.	k. H.	.	.	k. H.	k. H.	k. H.	k. H.	f. k. H.	f. k. H.	f. k. H.	p. H.
1:200	dgl.	dgl.	.	.	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.	f. k. H.	p. H.	p. H.	dgl.
1:300	„	„	.	.	„	„	„	„	p. H.	p. H.	p. H.	„
1:400	„	„	.	.	„	„	„	f. k. H.	p. H.	Sp. H.	Sp. H.	„
1:500	„	„	.	.	„	„	„	f. k. H.	Sp. H.	0	Sp. H.	Sp. H.
1:700	„	„	.	.	„	„	f. k. H.	p. H.	dgl.	0	0	0
1:900	„	„	.	.	„	p. H.	p. H.	Sp. H.	„	0	0	0
1:1000	„	„	.	.	„	Sp. H.	Sp. H.	0	0	0	0	0
3 K.	0	0	.	.	0	0	0	0	0	0	0	0
	B. Der Gehalt des Serums an Hämagglutininen.											
1:100	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1:200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1:300	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1:400	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1:500	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
K.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Also kann in der Niere des Meerschweinchens die Anwesenheit von heterogenetischen Hühner- und Schildkrötenantigenen konstatiert werden.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß in den Organen der Tiere des Meerschweinchentypus außer dem artspezifischen Antigen gleichzeitig mit ihm auch die artspezifischen Antigene des Hammels, des Huhnes und der Schildkröte enthalten sind — alle drei biochemische Komplexe — drei heterogenetische Antigene. Die Organe der Tiere des Kaninchentypus, die, wie bekannt, kein heterogenetisches Hammelantigen enthalten, werden von mir gegenwärtig auf die Anwesenheit von zwei anderen Antigenen — des Hühner- und Schildkrötenantigens — geprüft.

Bei der Immunisierung der Kaninchen mit Organen der Tiere vom Meerschweinchentypus erfolgt die Produktion von Hämolysinen, wie aus den Protokollen zu ersehen ist, für Hühner- und Hammelerythrozyten ungefähr in gleichem Maße. Für Schildkrötenerythrozyten werden dagegen Hämolysine nur in sehr beschränkten Mengen produziert. Man kann annehmen, daß das heterogenetische Antigen des Kaltblüters in geringeren Mengen in Zellen dieser Organe enthalten ist, als das Antigen der Warmblüter. (Zusammenfassende Tabellen I und II.)

Tabelle I.

Immunisierung der Kaninchen mit Hammel-, Hühner- und Schildkrötenerythrozyten.

Immunis. mit Erythroz. vom	Verdünnungen des Serums	Gehalt des Serums an Hämolysinen für Erythrozyten von: Hammel	Huhn	Schildkröte
Hammel	1:100	+ + + +	— + + +	— + + +
	1:200	+ + + +	— + + +	— + + +
	1:300	+ + + +	— + + +	— + + +
	1:400	+ + + +	— + + +	— — + +
	1:500	+ + + +	— — + +	— — + +
	1:700	+ + + +	— — + +	— — + +
	1:900	+ + + +	— — + +	— — + +
	1:1000	+ + + +	— — + +	— — — +
	3 K.	— — — —	— — — —	— — — —
Huhn	1:100	+ + + +	+ + + +	— — + +
	1:200	+ + + +	+ + + +	— — + +
	1:300	+ + + +	+ + + +	— — + +
	1:400	+ + + +	+ + + +	— — — +
	1:500	+ + + +	+ + + +	— — — +
	1:700	— + + +	— + + +	— — — +
	1:900	— + + +	— + + +	— — — —
	1:1000	— + + +	— + + +	— — — —
	3 K.	— — — —	— — — —	— — — —
Schildkröte	1:100	— — + +	— + + +	— + + +
	1:200	+ + + +	— + + +	— + + +
	1:300	+ + + +	— + + +	— — + +
	1:400	+ + + +	— + + +	— — + +
	1:500	+ + + +	— + + +	— — + +
	1:700	+ + + +	— + + +	— — + +
	1:900	+ + + +	— + + +	— — — +
	1:1000	— + + +	— + + +	— — — +
	3 K.	— — — —	— — — —	— — — —

Bemerkung: + + + + = komplette Hämolyse, — + + + = fast komplette Hämolyse, — — + + = partielle Hämolyse, — — — + = Spur von Hämolyse, — — — — = keine Hämolyse.

Tabelle II.

Immunisierung der Kaninchen mit Katzen-, Pferde- und Meerschweinchenniere.

Verdünnungen des Serums	Gehalt des Serums an Hämolysinen für Erythrozyten von			Verdünnungen des Serums	Gehalt des Serums an Hämolysinen für Erythrozyten von		
	Hammel	Huhn	Schildkröte		Hammel	Huhn	Schildkröte
Katzennierenantiserum 1:100	+ + + +	+ + + +	— + + +	Pferdenierenantiserum 1:100	+ + + +	+ + + +	— — + +
1:200	+ + + +	+ + + +	— + + +	1:200	+ + + +	+ + + +	— — + +
1:300	+ + + +	+ + + +	— — + +	1:300	+ + + +	— + + +	— — + +
1:400	+ + + +	+ + + +	— — + +	1:400	+ + + +	— — + +	— — — +
1:500	+ + + +	+ + + +	— — + +	1:500	+ + + +	— — + +	— — — —
1:700	+ + + +	+ + + +	— — — +	1:700	— + + +	— — + +	— — — —
1:900	+ + + +	+ + + +	— — — +	1:900	— + + +	— — — +	— — — —
1:1000	+ + + +	+ + + +	— — — —	1:1000	— + + +	— — — —	— — — —
3 K.	— — — —	— — — —	— — — —	3 K.	— — — —	— — — —	— — — —

Verdünnungen des Serums	Gehalt des Serums an Hämolysinen für Erythrozyten		
	Hammel	Huhn	Schildkröte
Meerschweinchennierenantiserum 1:100	+ + + +	+ + + +	— — + +
1:200	+ + + +	— + + +	— — — +
1:300	+ + + +	— + + +	— — — +
1:400	— + + +	— — + +	— — — +
1:500	— — — +	— — + +	— — — +
1:700	— — — —	— — — +	— — — +
1:900	— — — —	— — — +	— — — +
1:1000	— — — —	— — — —	— — — +
3 K.	— — — —	— — — —	— — — +

Doch kann die Tatsache, daß die Hämolyse der Schildkrötenerythrozyten bei geringerer Verdünnung aufhört als die Hämolyse von Hühner- und Hammelerythrozyten, wie wir oben gesehen haben, auch anders gedeutet werden. Wenn wir berücksichtigen, daß die Hämolyse der Schildkrötenerythrozyten auch bei Verwendung homologer Sera nicht sehr prägnant verläuft, und daß diese Erythrozyten eine große Stabilität gegenüber physikalischen und chemischen hämolytischen Reagentien besitzen, so müssen eben diese Erwägungen in den Vordergrund gestellt werden.

Ich bin überzeugt, daß die Reihe der biochemischen Komplexe, die verschiedenen Tierarten eigen sind, nicht durch die drei obenerwähnten heterogenetischen Antigene — das artspezifische Antigen des Hammels, des Huhnes und der Schildkröte — erschöpft wird. Ich bin überzeugt und besitze auch einige Daten, die diese Ueberzeugung stützen, daß in den Erythrozyten und in Organen von verschiedenen Tieren außer den erwähnten noch andere heterogenetische Antigene enthalten sind. Diese Tatsache ist sehr interessant und stellt, wie das Kritschewsky[1]) in einer früheren Arbeit hervorgehoben hat, ein wichtiges Argument für die Bestätigung des gemeinsamen Ursprunges der Tierarten dar.

1) Kritschewsky, Ztschr. f. Immunitätsf. Bd. 36. 1923, und Medic. Obosren. 1917. No. 13—16.

Außer den Fragen über den Gehalt von heterogenetischen Hämolysinen in verschiedenen Sera wurden diese Sera auch auf den Gehalt an heterogenetischen Hämagglutininen untersucht.

Ueber die heterogenetischen Hämagglutinine finden sich in der Literatur widersprechende Angaben.

Einige Autoren erhielten heterogenetische Hämagglutinine in genügenden Mengen. So fand J. L. Kritschewsky[1]) das Agglutinin für Hammelerythrozyten im Serum von Kaninchen, die mit Hühnererythrozyten immunisiert wurden, aber nicht umgekehrt. Forssman und Hintze[2]) fanden bei der Immunisierung mit Organen des Meerschweinchens heterogenetische Agglutinine für Hammelerythrozyten, doch nur in sehr kleiner Menge.

Doerr und Pick[3]) erkennen die Existenz von heterogenetischen Hämagglutininen nicht an, sie glauben sogar annehmen zu dürfen, daß das Fehlen dieser Antikörper die heterogenetischen Sera von den homologen unterscheidet. Friedberger und Schiff[4]) konnten gar keine heterogenetischen Hämaglutinine feststellen.

Auf Grund vieler Untersuchungen mit heterogenetischen Sera komme ich zu dem Schluß, daß diese Frage negativ zu beantworten ist.

Bei der Immunisierung von Kaninchen mit Hammelerythrozyten habe ich keine Hämagglutinine für Hühner- und Schildkrötenerythrozyten erhalten (für den Versuch wurde 1 ccm des Immunserums und 0,3 ccm einer 5proz. Aufschwemmung von Erythrozyten genommen) und umgekehrt. Bei der Immunisierung der Kaninchen mit Hühnererythrozyten werden keine Agglutinine für Schildkrötenerythrozyten gewonnen und umgekehrt.

Bei der Immunisierung der Kaninchen mit Hühnererythrozyten wurden keine Agglutinine für Hammelerythrozyten erhalten.

Bei der Immunisierung von Kaninchen mit Organen des Pferdes, der Katze, des Meerschweinchens fehlen im Kaninchenserum Agglutinine für Erythrozyten des Hammels, des Huhnes und der Schildkröte (siehe Protokolle).

Die Ursache der Meinungsverschiedenheit, die in der Literatur über die heterogenetischen Agglutinine herrscht, wird, wie es scheint, durch die Arbeiten von Trou-Hia-Hsü[5]) aufgeklärt. Dieser Autor hat gezeigt, daß die Zeitdauer, die vom Moment der Erythrozytenentnahme verstrichen ist, eine sehr große Rolle bei der Feststellung von heterogenetischen Hämagglutininen spielt. Dieser Verfasser bekam niemals eine heterogenetische Hämagglutination, sobald er frische Erythrozyten verwendete. Blieben hingegen dieselben Erythrozyten 3 Tage bei Zimmertemperatur stehen, so wurden sie durch dieselben Sera gut agglutiniert. Ich habe stets frische Erythrozyten genommen und von der Arbeit von Trou-Hia-Hsü erst zu einer Zeit Kenntnis erhalten, als die Mehrzahl meiner Versuche schon abgeschlossen war.

Zusammenfassung.

A. In den Organen und kernhaltigen Erythrozyten der Tiere des Meerschweinchentypus existieren neben artspezifischen Antigenen noch

1) Kritschewsky, loco cit.
2) Forssman u. Hintze, Biochem. Ztschr. Bd. 44. 1912.
3) Doerr u. Pick, loco cit.
4) Friedberger u. Schiff, Ztschr. f. Immunitätsf. Bd. 19. 1913.
5) Trou-Hia-Hsü, Ztschr. f. Immunitätsf. Bd. 34. 1922.

biochemische Komplexe, die gemeinsam bei den obenerwähnten Tieren und bei entfernten Tierarten vorkommen — heterogenetische Antigene. Es wurde die Existenz folgender heterogenetischen Antigene festgestellt: I. Schildkrötenerythrozyten enthalten heterogenetische Hammel- und Hühnerantigene. — II. Hühnererythrozyten enthalten außer dem heterogenetischen Hammelantigen auch das heterogenetische Schildkrötenantigen. — III. Hammelerythrozyten enthalten außer dem heterogenetischen Hühnerantigen auch das heterogenetische Schildkrötenantigen. — IV. Die Organe der Tiere des Meerschweinchentypus enthalten außer dem heterogenetischen Hammelantigen noch die artspezifischen heterogenetischen Antigene der Schildkröte und des Huhnes. — B. Es konnten keine heterogenetischen Hämagglutinine für Erythrozyten des Hammels, der Schildkröte und des Huhnes festgestellt werden (wenigstens bei Anwendung von frischen Erythrozytenaufschwemmungen).

Virulenzuntersuchungen mittels Methylenblau.

[Aus dem Path.-anatomischen Institut der Elisabeth-Universität in Pécs (Direktor: Dr. Béla v. Entz, o. ö. Professor).]

Von Dr. **Stefan Zoltán**, Assistenten des Institutes, und **Alfred Gajdos**, cand. med.

Das bei weitem gebräuchlichste, zur Bestimmung der Virulenz der Bakterien verwendete Verfahren ist der Tierversuch, ein kostspieliges, langwieriges, große Uebung erforderndes und unzählige Fehlerquellen aufweisendes Verfahren, und das Verlangen der Bakteriologen nach einer einfacher und schneller arbeitenden Methode ist daher verständlich. Bayer empfahl zur Bestimmung der Virulenz das metallische Silber, auf der alten Beobachtung fußend, daß um ein in die Kultur eingetauchtes Silberblech eine sterile Zone von verschiedener Breite zustande kommt, von deren Weite man nach Bayer auf die Virulenz der betreffenden Kultur schließen kann. Marx und Woithe brachten die Ernst Babesschen Körperchen mit der Virulenz in Zusammenhang und meinten, diese als Zeichen gesteigerter Pathogenität ansprechen zu können. Nach Ascolis Untersuchungen jedoch ist dieser Zusammenhang nicht gesetzmäßig. Keine der beiden Methoden konnte sich einbürgern; in der Literatur wurden sie ungünstig beurteilt, und in der Praxis fanden sie überhaupt keine Anwendung. So blieb der Tierversuch das einzige Mittel zur Beurteilung der Virulenz, und die Schwerfälligkeit und Unzuverlässigkeit dieser Methode ist verantwortlich, daß über die die Virulenz steigernden und herabsetzenden Einflüsse in der Literatur die widersprechendsten Angaben zu finden sind.

Im folgenden möchten wir über eine Methode berichten, die infolge ihrer Kürze und Einfachheit sowie ihrer Empfindlichkeit unserer Meinung nach zur Bestimmung der Virulenz der Bakterien geeignet ist.

Das Verfahren beruht auf dem gegenüber dem Methylenblau gezeigten Verhalten der Bakterien. Das Methylenblau wird bekanntlich durch die Bakterien zu einer farblosen Leukoverbindung reduziert, was aber bei den verschiedenen Stämmen in sehr verschiedener Zeit der Fall ist und kann auch zu diagnostischen Zwecken verwendet werden, z. B. zur Unterscheidung des Typhus vom Coli. Aber nicht nur die verschiedenen Arten, sondern auch die virulenteren und weniger virulenten Stämme einer und derselben Art zeigen gesetzmäßige Verschiedenheiten der Reduktionszeit. Unsere Methode zeigt, wie aus den unten ausführlich zu beschreibenden Versuchen ersichtlich ist, die durch die verschiedensten Methoden beeinflußten Virulenzverhältnisse pünktlich an und ist so empfindlich, daß die Wirkungen verschiedener, wahrscheinlich nur minimale Veränderungen der Virulenz verursachenden Einflüsse noch deutlich beobachtet werden können.

Von unseren Versuchen können wir im folgenden berichten:

1) Zur Zeit der Versuche waren unsere Standardkulturen ungefähr 6 Monate alt. Von diesen verimpften wir 14 Tage vorher Paratyphus A, Paratyphus B und Coli auf Agarröhren und verglichen das gegenüber dem Methylenblau gezeigte Verhalten dieser 14 Tage alten Kulturen mit dem Verhalten der aus den alten Kulturen gewonnenen 24stünd. Stämme. Die Methylenblaubouillon wurde durch die jungen Kulturen in 6 Std. reduziert, während in den mit den 14tägigen Kulturen geimpften Röhren noch keine Veränderung sich zeigte und die Reduktion erst nach Stunden zustande kam. Da es sich um alte, d. h. in ihrer Virulenz stark herabgesetzte Stämme handelte, ist es nicht wahrscheinlich, daß zwischen den 2 Wochen alten und 24stünd. Kulturen ein wesentlicher Unterschied in der Virulenz bestand, und doch zeigte unser Verfahren genau den Unterschied.

2) Wir schwächten die Virulenz unserer Stämme, indem wir Paratyphus A, Paratyphus B, Coli und Staphylokokken in Bouillon verimpften und die Röhren nach 24 Std., als ihr Inhalt sich trübte, für $2^1/_2$ Std. teils einer Temperatur von 70° C, teils einer von 56° C aussetzten; 4 Röhren versetzten wir vor der Impfung mit je 1 ccm einer 0,5prom. Phenollösung. Von sämtlichen Röhren und als Kontrolle auch von den in Bouillonröhren im Brutschranke bei 37° C gezüchteten Stämmen derselben Arten verimpften wir auf Methylenblaubouillon und fanden, daß von den einzelnen Stämmen immer die aus der Kontrollröhre geimpften zuerst reduzierten. Die sicher bewiesene, virulenzabschwächende Wirkung dieser von uns versuchten verschiedenen Verfahren wurde demnach auch durch unsere Methode eindeutig angezeigt.

3) Wenn wir verschiedene Bakterienarten in Methylenblaubouillon verimpfen, finden wir Stämme, welche das Methylenblau entweder gar nicht oder nur nach längerer Zeit entfärben. So verhalten sich z. B. die Typhusbakterien und die Streptokokken. Wenn wir mit Coli, Shiga-Kruse, Typhus und Streptokokken den Versuch gleichzeitig anstellen, sehen wir nach 12 Std. die Coli- und Shiga-Röhren reduziert, während die Typhus- und Streptokokkenröhren unverändert erscheinen. Wenn wir nun von diesen Methylenblaubouillonröhren auf Agar verimpfen, finden wir, daß die Coli- und Shiga-Kruse-

Bakterien auswachsen, während die mit Typhus und Streptokokken geimpften Röhren steril bleiben oder nur sehr verzögertes und spärliches Wachstum zeigen.

Dies beweist, daß das Methylenblau selbst einzelne Bakterienarten vernichten oder wenigstens ihre Virulenz stark herabzusetzen imstande ist. Wir hielten es daher für wahrscheinlich, daß das Methylenblau auch die Virulenz der schnell reduzierenden Stämme herabsetzt, und führten zur Bestätigung dieser Voraussetzung folgenden Versuch aus: Coli- und Paratyphus A-Bakterien, welche schnell reduzieren, wurden auf Methylenblaunährböden gezüchtet in der Weise, daß wir die Bakterien in Methylenblaubouillon überimpften, nach erfolgter Reduktion von der Bouillon wieder auf Agar zurückimpften und dies Verfahren eventuell wiederholten. Wenn wir nun die Röhren der ursprünglichen Coli- und Paratyphus A-Bakterien (CM, PtyAM) mit denen der einmal (CM_1, Pty AM_1) resp. 2mal (CM_2, Pty AM_2) in Methylenblaubouillon gezüchteten vergleichen, fanden wir nach $5^1/_2$ Std.:

In den Röhren	CM:	vollständige Reduktion
„ „ „	Pty AM:	„ „
„ „ „	CM_1:	Farbe blasser
„ „ „	Pty AM_1:	„ „
„ „ „	CM_2:	Farbe unverändert
„ „ „	Pty AM_2:	„ „

Dies bedeutet, daß die Stämme, die das Methylenblau schon einmal passiert haben, die Farbe später, die aber etliche Mal durch Methylenblau geführten noch viel später reduzieren.

4) Wir führten den Versuch auch mit vom lebenden Körper isolierten Coli- und Typhusbakterien aus und verglichen die Reduktionszeiten mit denen unserer alten Standardkulturen. Der höheren Virulenz der vom Körper isolierten Stämme entsprechend, erhielten wir folgendes Ergebnis:

Coli, aus dem Lebenden kürzlich isoliert:	Reduktion nach $3^3/_4$ Std.
Coli, längere Zeit künstlich gezüchtet:	„ „ 7 „
Typhus, aus dem Lebenden kürzlich isoliert:	„ „ 12 „
Typhus, längere Zeit künstlich gezüchtet:	„ tritt überhaupt nicht, oder erst nach Tagen auf.

Die Methylenblaubouillon bereiteten wir zu unseren Versuchen folgendermaßen: Das käufliche Loefflersche Methylenblau verdünnten wir mit dem 5fachen Vol. Wasser und gaben von dieser Lösung 0,6 ccm zu 4 ccm Bouillon. Die Reduktion wurde im Brutschranke bei 37° C vorgenommen. Wichtig ist es, in die einzelnen Röhren möglichst konstante Mengen der Bakterien einzuführen. Man arbeitet am besten immer mit einer und derselben Oese. Da die Versuchsergebnisse verschiedener Forscher nur in dem Falle verglichen werden können, wenn bei der Bestimmung der Reduktionszeit immer dieselbe Phase in Betracht kommt, halten wir die Annahme einer Testfarblösung für äußerst notwendig.

Am zweckmäßigsten fanden wir es, den Eintritt der Reduktion von jenem Zeitpunkte zu rechnen, in welchem die Farbe der Versuchsröhre mit der einer 4 ccm Bouillon und 0,3 ccm der auf das 5fache verdünnten Methylenblaulösung enthaltenden Röhre übereinstimmt.

In unseren Versuchen, bei denen wir die verschiedensten, die Virulenz schwächenden Verfahren versuchten, erhielten wir gänzlich eindeutige Resultate und waren fähig, auch so geringe Veränderungen der Virulenz anzuzeigen, die mit dem Tierversuche nicht bestimmt

werden können. Das Verfahren ist kurz, einfach und das Ergebnis leicht abzulesen, welche Vorteile unserer Meinung nach dem Verfahren in den Laboratorien das Bürgerrecht verschaffen können.

Weitere klinische Versuche müssen zeigen, ob die Methode auch prognostisch verwertbar ist. Zu diesem Zwecke halten wir das Anstellen der Reaktion mit den in gesetzmäßigen Zeiträumen während des Ablaufes der fraglichen Infektionskrankheiten isolierten Stämme für notwendig, sowie den Vergleich von deren Ergebnissen mit dem Krankheitsverlaufe. Wenn unsere Methode auch hier gesetzmäßige Zusammenhänge aufweisen sollte, hätten wir allenfalls einen tieferen Einblick in die Pathogenese der Infektionskrankheiten und kämen vielleicht auch der wichtigen Frage der Bestimmung der Resistenz des Körpers etwas näher. Besonders wichtig wäre es, zu untersuchen, wie die Organismen verschiedener Konstitution auf Bakterieninfektion derselben Virulenz reagieren.

Nach vollständigem Abschluß unserer Arbeit bekamen wir die Mitteilung von Louros und Fuß (Klin. Woch. 9. IV. 1925) zu lesen, die, mit anderer Methodik, jedoch ebenfalls die Anwendung des Methylenblaues zur Virulenzbestimmung empfiehlt. Das gleiche Ergebnis der voneinander gänzlich unabhängigen und mit verschiedener Methodik ausgeführten Versuche betrachten wir als Beweis der Zuverläßlichkeit der von beiden Seiten gefundenen Gesetzmäßigkeiten und des ganzen Verfahrens.

Zur Anwendung des Methylenblaues in der bakteriologischen Diagnostik.

[Aus dem Pathologisch-anatomischen Institut der Elisabeth-Universität in Pécs (Direktor: Dr. Béla v. Entz, o. ö. Professor).]

Von Dr. **Stefan Zoltán**, Assistent des Instituts.

Als ich die hemmende Wirkung der vitalen Farbstoffe und besonders ihres gewöhnlichsten Vertreters, des Methylenblaues, auf das Wachstum der Bakterien untersuchte, machte ich Beobachtungen, die nicht ohne Interesse sind, da sie nach Vervollkommnung der Methodik meines Erachtens zur Unterscheidung der einzelnen Bakterien von Nutzen sein können. Meine Untersuchungen beziehen sich in erster Linie auf die Typhus-Coli-Gruppe (Typhus, Paratyphus A, Paratyphus B, Coli) daneben aber auch auf den B. Proteus, den B. dysenteriae Shiga-Kruse und noch einige andere Bakterienarten.

Das Wesen meiner Versuche möchte ich kurz im folgenden schildern:

Gleiche Mengen von Nährbouillon wurden durch Hinzufügen bestimmter Mengen einer Standard-Methylenblaulösung gefärbt, in die so zubereiteten gefärbten Röhren je 1 Oese der reinen Agarkultur der betreffenden Bakterienart verimpft und die Röhren im Brutschrank bei 37° C aufbewahrt. Als ich die Röhren nach 2 Std. untersuchte, fand ich, daß in der mit Coli geimpften Röhre die blaue, klare Nährflüssigkeit blasser und zugleich trübe wurde, das Methylenblau begann in Form blauer Flocken auszufallen. Nach ca. 4 Std. war der Vorgang beendet; an der Oberfläche schwammen blaue Flocken, die Flüssigkeit selbst war blaß gelbgrün geworden. Nach einer Nacht im Brutschrank verblaßte die Emulsion gänzlich, nur ihre Oberfläche zeigte eine

schwachgrünliche Farbe. In den mit Bacillus dysenteriae Shiga und Paratyphus A geimpften Röhren trat die Entfärbung ungefähr 1 Std. später auf; in den mit Proteus geimpften Röhren trat zwar die Entfärbung zu gleicher Zeit wie in der Coli-Röhre ein, sie war aber nach halbtägigem Verweilen im Brutschrank nie so vollständig, wie in der mit Coli geimpften Röhre. In der mit Typhus geimpften Röhre tritt Entfärbung manchmal überhaupt nicht ein, in anderen Fällen sind die ersten Anfänge des Vorganges nach ungefähr 8 Std. zu beobachten, seinen Höhepunkt erreicht der Prozeß nach ungefähr 36 Std. Noch einige Stunden länger dauert der Eintritt der Entfärbung in den mit Paratyphus B geimpften Röhren. Die letztgenannten Bakterienarten rufen überhaupt keine vollständige Entfärbung hervor, die blaue Farbe wird nur blasser grünlich, und eine minimale Ausflockung des Methylenblaues ist zu beobachten. Die Versuche wurden mehrfach wiederholt. Wie oben erwähnt, blieben die mit Typhus und Paratyphus B geimpften Röhren oft steril, in den anderen war ein Wachstum der Bakterien stets zu erkennen.

Da die Zeit der Entfärbung für die einzelnen Bakterienarten sozusagen charakteristisch ist, untersuchte ich auch das Verhalten der mit Methylenblau gefärbten festen Nährsubstrate (Agar, Gelatine). Meine diesbezüglichen Erfahrungen kann ich in folgendem zusammenfassen:

Die Kulturen zeigen auf gefärbtem Schrägagar einerseits und auf Agarplatten andererseits ein ungleiches Verhalten. Dieser Unterschied wird meines Erachtens durch die verschiedene Massenverteilung des Nährsubstrates bedingt.

Die Typhusbakterien wachsen schwer auf dem gefärbten Agar und bilden spärliche isolierte Kolonien, deren Wachstum alsbald aufhört, auch ist nach Tagen keine weitere Vermehrung zu beobachten. Auf den Platten bilden die Typhusbakterien blaue scharf umränderte Kolonien, die nur ganz langsam verblassen. Die Kulturen müssen bei Tageslicht betrachtet werden; die jungen Kolonien sind blau, die älteren in auffallendem Lichte blau, in durchfallendem grünlich. Die Farbe der Kolonien verblaßt langsam, nach Tagen wird sie verwaschen und unbestimmt. Coli-Bakterien gedeihen gut auf dem gefärbten Schrägagar. Schon nach 6 Std. Brutschrankaufenthalt ist Entfärbung des ursprünglich blauen Kondenswassers zu beobachten. Die Entfärbung des Agars nimmt aus den tiefsten, d. h. dicksten Schichten ihren Ausgang, nach 18 Std. ist der Agar am Boden der Röhre gelb geworden. Die Entfärbung schreitet aufwärts weiter, die Kolonien wachsen üppig, doch überschreitet die Entfärbung nie die untere Hälfte der Röhre und steht hier nach etwa 36 Std still, ja wenn wir die Röhre weiter im Brutschrank lassen, nehmen bereits entfärbte Teile wieder grünliche Farbe an. Die Kolonien sind dick und schillern, in durchfallendem Lichte betrachtet, grünlich. Auf gefärbten Agarplatten bilden die Coli-Bakterien schnell wachsende, zerfließende Kolonien, deren Ränder verwaschen erscheinen. In durchfallendem Lichte zeigen schon die jungen Kolonien eine ausgesprochen grünliche Verfärbung, ihre Umgebung ist auch gelbgrün, im auffallenden Lichte zeigen die jungen Kolonien blaue, die älteren grüne Farbe. Die Paratyphus A-Bazillen entfärben in Schrägagarröhren das Kondenswasser und in geringerem Grade auch den Nährboden; die Kolonien entwickeln sich mit mäßiger Geschwindigkeit. Auf Platten bilden sie scharf begrenzte, nicht zerfließende Kolonien, die in durchfallendem Licht farblos, im auffallenden blaßbläulich erscheinen.

Die Paratyphus B-Bakterien entwickeln sich auf dem Schrägagar etwas langsamer, auf Platten bilden sie ebenfalls scharf begrenzte, nicht zerfließende Kolonien, die in durchfallendem Licht innerhalb eines gelblichen Randes eine allmählich grün werdende blaue Zone aufweisen. Die Shiga-Bakterien entfärben das Kondenswasser und auch den Nährboden, wenn auch nicht in dem Maße, wie dies die Coli-Bakterien bewirken. Auf Platten bilden sie ziemlich scharf umgrenzte, nicht zerfließende Kolonien, deren Randpartien gelblich, die mittleren dagegen bläulich erscheinen. Die Proteus-Bakterien wachsen gut auf dem gefärbten Agar; auf Platten bilden sie scharf umgrenzte, nicht zerfließende Kolonien; in durchfallendem Licht sind schon die jungen Kolonien gelblich, im auffallenden blaugrau verfärbt.

Bei den Bouillonversuchen füllte ich in die Röhren je 4 ccm der gewöhnlichen Pepton-Bouillon und tat 0,6 ccm einer 6mal verdünnten Methylenblaulösung (5 ccm einer sterilen phys. NaCl-Lösung + 1 ccm sterile käufliche Löfflersche Methylenblaulösung) hinzu. Bei meinen ersten Versuchen tat ich verschiedene Mengen des Methylenblaues in die Röhren, so z. B. 0,3, 0,5, 0,6, 0,8 und 1,0 ccm der oben erwähnten verdünnten Lösung zu 4 ccm Bouillon. Wenn ich aber zu wenig Farblösung in die Röhren brachte, waren die Farbentöne nicht so scharf, wenn ich dagegen zuviel Farbe verwendete, hemmte dies das Wachstum der Bakterien derart, daß die oben erwähnten empfindlicheren Arten gar nicht auswuchsen. Als geeignetste Menge fand ich 0,6 ccm, die ich später stets verwendete.

Den gefärbten Agar bereitete ich stets kurz vor dem Versuche. Zu 4 ccm des gelösten Agars tat ich ebenfalls 0,6 ccm der verdünnten Farblösung, schüttelte kurz, aber kräftig durch und ließ ihn erstarren. Ich verfuhr in dieser Weise, da bei dem Schmelzen des bereits gefärbten Agars die schöne blaue Farbe desselben etwas abblaßte und die ursprüngliche Farbe auch später nicht völlig wiederkehrte. Auch das exakte Abmessen der Mengen mittels steriler Pipetten halte ich für außerordentlich wichtig, da die Farbtöne der einzelnen Röhren am Anfang des Versuches nur in diesem Falle völlig einander gleichen, wodurch Versuchsfehlern möglichst vorgebeugt werden kann.

Zur Verwertung meiner oben beschriebenen Resultate stellte ich auch Versuche mit Stämmen verschiedener Abstammung einer und derselben Bakterienart an, und fand z. B., daß 2 Coli-Stämme verschiedener Herkunft das Entfärben der mit Methylenblau versetzten Bouillon in verschiedenen Zeiten vollbrachten. Die Unterschiede sind zwar nicht groß, doch können sie $^1/_2$—1 Std. betragen. Ich fand auch, daß aus dem typhösen Darminhalt, aus der Galle, der Milz isolierte Typhusstämme, die dort mit Coli zusammen wuchsen, schneller entfärbten als die längere Zeit künstlich und rein gezüchteten Standard-Kulturen. Kontrollversuche zeigten, daß in den mit Coli geimpften Röhren die Entfärbung nur um etwa 2 Std. früher als in den mit frisch isolierten Typhusbakterien geimpften Röhren eintrat, und die Entfärbung des Nährbodens am Ende des Versuches ebenso vollständig ist, wie in den mit Coli geimpften Röhren. (Diese Kulturen waren vielleicht — trotz aller Mühe — nicht ganz rein.) Zurzeit setze ich meine Versuche in der Richtung fort, ob nach längerer künstlicher Züchtung und peinlichster Sorgfalt in betreff der Reinigung der Kulturen die Entfärbungszeit sich wieder verlängert und wenn, nach welcher Zahl der Ueberimpfungen. Diese Annahme kann ich jetzt schon bestätigen.

Um die praktische Verwendbarkeit dieser Beobachtungen festzustellen, versuchte ich die Entfärbungszeit auch bei Mischimpfungen zu bestimmen. Aus diesen Versuchen ging hervor, daß Coli mit Typhus zusammen verimpft die gefärbte Bouillon in gleicher Zeit; ja manchmal noch schneller entfärben und die Entfärbung so vollständig ist, als wenn Coli allein verimpft worden wäre, und dasselbe Verhalten zeigt Coli mit Paratyphus A zusammen verimpft. Bei Typhus + Paratyphus A ist die Entfärbung etwas langsamer, ungefähr der Entfärbungszeit des Paratyphus A entsprechend. Typhus + Paratyphus B entfärben ungefähr in der den Typhus-Bakterien entsprechenden Zeit, während in den mit Typhus und Proteus geimpften Röhren die Entfärbungszeit der des Proteus entspricht.

Aus diesen Beobachtungen geht hervor, daß in Bouillon die Coli-, Paratyphus A-, Proteus- und Shiga-Kruse-Bazillen das Methylenblau binnen kürzester Frist zerstören, während die gefärbten festen Nährsubstrate (Methylenblauagar) nur durch Coli entfärbt werden. durch die anderen Arten dagegen nicht oder nur in geringem Grade. Diese Feststellung gilt auch für die gemischten Impfungen der genannten Bakterien mit anderen Arten, wodurch eine hemmende Wirkung der anderen Arten ausgeschlossen werden kann, wenn nur die ursprünglichen Bakterien in genügender Anzahl vorhanden sind. Es ist selbstverständlich, daß im Falle einer Mischimpfung von nur sehr wenig Coli mit Typhusbazillen die Vermehrung der Coli-Bakterien längere Zeit in Anspruch nimmt, und daß der Eintritt der Entfärbung dadurch etwas verzögert wird.

Nach diesen Feststellungen war es von größter Wichtigkeit, die Ursache der Entfärbung der Röhren, d. h. der Zerstörung des Methylenblaues zu bestimmen. Es mußte festgestellt werden, ob dieser Vorgang etwa durch Stoffwechselprodukte verursacht oder gar ein spezifischer sei, der Vorgang mußte auch chemisch verfolgt werden.

In der Literatur fand ich folgende, die durch Bakterien verursachte Veränderung des Methylenblaues besprechende Mitteilungen:

Fr. Müller (Ueber reduzierende Eigenschaften von Bakterien, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 26. 1899) untersuchte die reduzierende Wirkung der Bakterien; zu diesem Zwecke ließen sich Methylenblau und Lackmus sehr gut verwenden. Methylenblau ist, in den Nährboden gemischt, am leichtesten reduzierbar. Coli reduziert beide Farben. Typhus nur Methylenblau, der Vorgang ist reversibel, und die Lösung nimmt, mit Luft umgeschüttelt, ihre ursprüngliche Farbe wieder an, um danach wieder zu verblassen. In einer anderen Mitteilung (Centralbl. f. Bakt. Bd. 26. 1899: Ueber das Reduktionsvermögen der Bakterien) verwendet er mit Methylenblau, Lackmus und essigsaurem Rosanilin gefärbte Nährböden. Als Ergebnis seiner neueren Untersuchungen stellt er fest, daß nicht die Bakterien, sondern ihre Stoffwechselprodukte die Reduktion zustande bringen. Er meint dies, da die Entfärbung des Methylenblauagars von einer bewiesen sterilen Stelle ausgeht. Die von ihm gebrauchte Verdünnung ist 10 ccm einer 1promill. wässerigen Methylenblaulösung zu 1000 ccm Nährboden.

Cahen (Ueber das Reduktionsvermögen der Bakterien, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 2) beschäftigte sich auch mit dem Reduktionsvermögen der Bakterien. Er verwendete Methylenblau und Lackmus und kam zu dem Schlusse, daß Anaërobier die Farbe schneller zerstören.

Spina (Centralbl. f. Bakt. Bd. 2. 1887) beobachtete ebenfalls die Entfärbung des Methylenblaues. Er hält den Vorgang für Reduktion und beobachtete, daß derselbe von den Kolonien seinen Ausgang nimmt.

Ich versuchte in meinen entfärbten Röhren die Reoxydation vorzunehmen, doch kehrte die Farbe des Methylenblaues auch nach dauerndem Schütteln mit Luft nicht wieder. Unbestreitbar zeigte sich aber eine nach 2—3 Min. wieder verschwindende, blaßgrünliche Farbe. Gleichfalls

beobachtete ich, daß in Agarröhren die Entfärbung von der dicksten, d. h. an Luft ärmsten, Schicht ausging. Ich versuchte auch, die mit Bakterien geimpften Röhren mit stark reduzierenden Stoffen (0,2 ccm einer 1proz. Pyrogallol-Lösung zu jeder Röhre) zu versetzen, erreichte aber keine Entfärbung des Methylenblaues. Dies entspricht auch den Beobachtungen Müllers, der Methylenblau gleichfalls nur durch Wasserstoff in statu nascendi in die Leuko-Verbindung überzuführen vermochte.

Danach wollte ich den wichtigen Umstand klarlegen, ob die Entfärbung des Methylenblaues eine spezifische Eigenschaft bestimmter Bakterienarten oder aber ein rein physiko-chemischer Prozeß sei. Zu diesem Zwecke verimpfte ich die verschiedenen Bakterienarten in gewöhnliche Bouillon und achtete darauf, daß die Trübung der einzelnen Röhren annähernd die gleiche war. Dies erreichte ich, indem ich die in Bouillon sich schnell vermehrenden Arten bei Zimmertemperatur, die sich langsamer vermehrenden dagegen im Brutschrank züchtete. Wenn die Trübung der Röhren optisch annähernd die gleiche war und ich nunmehr die Kulturen mit Methylenblaulösung versetzte, fand ich, daß die Entfärbung in allen Röhren zugleich oder in ganz kurzen Zeitunterschieden zustande kam. Dieser einfache Versuch zeigt, daß die Reaktion ein nichtspezifischer, und höchst wahrscheinlich ein physiko-chemischer Vorgang ist. Ich nehme an, daß zur Reduktion des Methylenblaues eine gewisse Dichte der Bakterienemulsion vonnöten ist; ohne sie tritt die Entfärbung nicht ein. Ich verfertigte aus sterilem Oel und Bouillon sterile Emulsionen und versuchte, ob solche die Entfärbung auch hervorrufen können, und fand, daß die ursprüngliche Farbe des Methylenblaues sich zwar verändert, grünbraun und blasser wird, die Emulsion aber stets homogen bleibt. Dies beweist auch, daß die Reaktion an die Bakterien gebunden ist. Da ich auch daran dachte, daß die durch die Bakterien produzierten schwachen Säuren zur Entfärbung des Methylenblaues beitragen können, versetzte ich sterile und geimpfte Röhren mit verschiedenen organischen und anorganischen, verschieden dissoziierenden Säuren, doch stellte sich in den sterilen Röhren überhaupt keine Entfärbung ein, in den geimpften dagegen zeigte die Zeit der Entfärbung gegenüber den mit Säure nicht behandelten Röhren keinen wesentlichen Unterschied. Ich versuchte es mit Salz- und Salpetersäure und von den organischen mit Ameisen-, Essig- und Aethylidenmilchsäure. Eine Verlängerung der Entfärbungszeit konnte ich auch durch Zugabe von Lauge nicht erreichen, ja bei den Shiga-Kruse-Bakterien zeigte die Entfärbungszeit eine geringe Verkürzung. Dies ereignete sich 3mal unter 5 Versuchen, doch glaube ich, daß es wohl Zufall gewesen sein kann. Die Säure hat daher keinen Einfluß auf die Reaktion.

Zu meinen Versuchen verwendete ich, wie schon erwähnt, die käufliche Löfflersche Methylenblaulösung (30 Gew.-Teile konz. alkoholischer Methylenblaulösung + 100 Gew.-Teile 1 $^0/_{00}$ KoH-Lösung). Die oben erwähnten Autoren gebrauchten wässerige Farblösungen. Ich fand keine Mitteilung von der stärker hemmenden Wirkung der alkoholischen Löfflerschen Methylenblaulösung.

Das Methylenblau ist ein sog. „Thionin"- (d. h. schwefelhaltiger Farbstoff, und seine Zusammensetzung ist: Aminodimethylanilinthiosulfosäure.

Das Ergebnis meiner Untersuchungen kann ich kurz im folgenden zusammenfassen:

Das Methylenblau hemmt das Wachstum der Bakterien; diese hemmende Wirkung fällt aber gegenüber den Bakterien verschiedener Vitalität und Virulenz verschieden stark ins Gewicht. Die sich vermehrende Bakterienart reduziert durch ihr Zellplasma oder durch ihre Stoffwechselprodukte den Farbstoff. Die Entfärbung stellt sich je nach dem Grade der Hemmung in kürzerer oder längerer Zeit ein. Die empfindlichsten Bakterien vermehren sich überhaupt nicht in dem mit Methylenblaulösung versetzten Nährboden, weshalb auch deren Farbe erhalten bleibt.

Es beansprucht noch längere Zeit, bis die Versuche mit den verschiedensten Arten vollzogen werden und die Arten auf diese Weise unterschieden sowie die Entfärbungszeiten genau bestimmt werden können. Vielleicht kann aber diese Methode zu der großen und oft nur zu schwierigen Frage der Identifizierung der Bakterien auch beitragen.

Objektträger für Untersuchungen bei Dunkelfeldbeleuchtung.

(Aus den optischen Werken von C. Reichert, Wien.)

Von **Oskar Heimstädt.**

Mit 1 Abbildung im Text.

Eine nicht eindringlich genug hervorzuhebende Vorschrift beim Gebrauch von Spiegelkondensoren besagt, daß die Flüssigkeitsschicht zwischen Objektträger und Deckglas so dünn als möglich gehalten werden soll. Besonders wichtig ist die Einhaltung dieser Vorschrift bei der mit Hilfe der Dunkelfeldbeleuchtung vorgenommenen Frühdiagnose der Syphilis.

Bei dieser läßt es sich nicht vermeiden, daß Haufen von Epithelzellen, Blutkörperchen u. dgl. der Präparatflüssigkeit beigemengt werden, welche wegen ihrer Massigkeit die beleuchtenden Strahlen durch Brechung und Reflexion ablenken und dadurch die nur abgebeugtes Licht aussendenden Spirochäten überstrahlen. Die Beschränkung der Objekte, welche die Wahrnehmung der den eigentlichen Untersuchungsgegenstand bildenden erschweren, läßt sich nur dadurch erreichen, daß die zu untersuchende Schicht so dünn als möglich gemacht wird.

Wenn die Oberflächen von Objektträger und Deckglas ebene Flächen bilden, kann dieser Bedingung unschwer genügt werden. Durch einen leichten Druck läßt sich die Präparatflüssigkeit gleichmäßig verteilen und ihr Ueberschuß entfernen. Während die Objektträger im allgemeinen genügend ebene Oberflächen besitzen, ist das aber bei den käuflichen Deckgläschen nur selten der Fall, was auf ihre Herstellungsart zurückzuführen ist. Eine gleichmäßige dünne Verteilung der Präparatflüssigkeit ist nur in wenigen Fällen zu erzielen.

Durch eine sehr einfache Gestaltung des Objektträgers läßt sich aber erreichen, daß auch in dem gekennzeichneten Sinn fehlerhafte Deckgläser das Zustandekommen einer dünnen, gleichmäßigen Präparatschicht nicht hindern. Bei diesen Objektträgern, welche die Firma C. Reichert in Wien zu ihren Spiegelkondensoren liefert, liegt das

Deckglas *D* auf einem über die Oberfläche *O* des Objektträgers ragenden kreisförmigen Sockel auf, welcher von einer schmalen ringförmigen Rinne *R* umgeben ist (s. Abb.). Die Sockelfläche ist im Verhältnis zu dem gebräuchlichen Format der Deckgläser klein (Durchmesser 12 mm). Infolgedessen erstreckt sich die Adhäsionswirkung der Flüssigkeit nur auf einen Teil des Deckglases *D*, welcher sich leicht der ebenen Oberflächenform des Sockels anpaßt. Der Ueberschuß der Präparatflüssigkeit *P* fließt in die Rinne *R* ab. Der Höhenunterschied zwischen der Sockelfläche und der Oberfläche des Objektträgers ist so gering, daß der Herstellung von Dauerpräparaten keine Schwierigkeiten entgegenstehen.

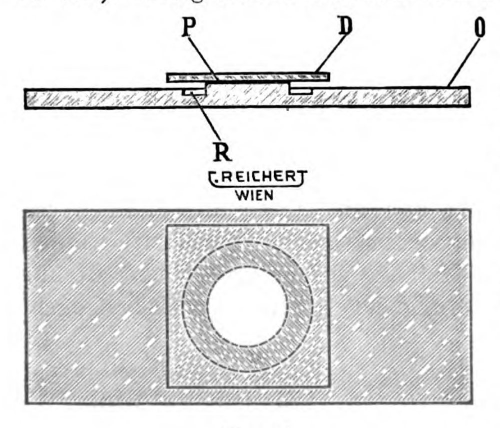


Fig. 1.

Die durch Abschleifen erniedrigte Oberfläche *O* des Objektträgers ist nicht poliert. Diese Unterlassung ist in erster Linie mit Rücksicht auf eine wohlfeilere Herstellung erfolgt. In zweiter Linie soll sie aber ermöglichen, Notizen (Namen oder Nummer des Patienten, Befund) unmittelbar mittels Bleistift oder Tintenfeder auf die matte Oberfläche des Objektträgers zu schreiben, ohne sich eines aufgeklebten Papierstreifens bedienen zu müssen. Mit der Reinigung des Objektträgers erfolgt gleichzeitig die Beseitigung der Schrift.

Für den klinischen Dienst scheint dem Verfasser die Mattierung der Objektträgerflächen, soweit diese nicht dem Licht Durchlaß gewähren müssen, so vorteilhaft, daß er den Vorschlag macht, diese Methode auch auf Objektträger gewöhnlicher Art auszudehnen. Die Herstellungskosten können die gewöhnlicher Objektträger nicht sehr übersteigen, wenn es sich einschlägige Erzeugungsstätten angelegen sein ließen, Objektträger dieser Art als Massenartikel herzustellen.

Inhalt.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena — 5376

Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Originale. Bd. 96. Heft 3/4.

Ausgegeben am 10. Oktober 1925.

Zur Frage vom Vorhandensein der Kerne bei den Bakterien.

[Aus dem Laboratorium des Lehrstuhls für Epizootologie am Donischen Veterinärinstitut Novotscherkassk, Rußland (Leiter: Prof. N. A. Pokschyschewski).]

Von **S. K. Bessubetz,**

Assistenten am Lehrstuhl für Epizootologie.

Meine Untersuchungen stellte ich an einigen Saprophyten und pathogenen Mikroorganismen, Krankheitserregern bei Haustieren, an. Nach der Methode von Kitajew[1]) beim Bac. anthracis untersuchte ich folgende Bakterien, und zwar: von Saprophyten Bac. pseudoanthracoïdes Hueppe, Bac. subtilis und Sarcinen, ferner Rotzbazillen und den Bac. suisepticus. Verändert wurde von mir die Methode von Kitajew nur insofern, als für eine jede Bakterienart noch andere, das Deutoplasma[2]) auflösende Reagentien genommen wurden. Außer der Giemsa-Färbung benutzte ich Hämatoxylinwasserlösung, Methylgrün und Leishmans Farben, welche auch die Kerne färben.

Bacillus anthracis.

Bei der Untersuchung von Agarkulturrasen dieses Bazillus gebrauchte ich als Lösungsmittel für das Deutoplasma eine $^1/_2$proz. Lösung von Natr. causticum. Die Emulsion, die aus 4—6stünd. Milzbrandkultur in Laugelösung erhalten wurde und 24 Std. im Brutschrank stand, zeigte beim Giemsa-Färbungsverfahren dasselbe Bild, wie es Kitajew in seiner oben erwähnten Arbeit beschreibt: Auf allen Präparaten waren Stäbchen mit eingeschlossenen Kernen sichtbar, und zwar handelte es sich meistenteils um 1 Kern, selten 2, 3, von denen mehrere bereits geteilt waren. Die Zellteilung selbst war aber nicht zu sehen. Die Stäbchen einer 10stünd. Kultur hatten nach Behandlung mit Lauge auf dem Strich die Gestalt langer Fäden, in denen bereits der Zerfall in feine Chromatinkörnchen sichtbar war. In jeder Zelle fanden sich 5—8, in andern auch mehr Körnchen. Diese waren unregelmäßig verteilt und später umgekehrt miteinander verbunden. Auch die Bildung zweier Kerne, die in bestimmter Entfernung von einander lagen, wurde festgestellt. Das Bild erinnerte an junge, einer 6stünd. Kultur entnommene Zellen. Bald danach bilden sich gewöhnlich Sporen.

Dieser Prozeß beginnt nach Ansicht einiger Forscher damit, daß ein Tochterkern sich zu färben aufhört und die Gestalt einer glänzenden, runden Spore annimmt. Nach der wahrscheinlicheren Ansicht von Got-

1) Kitajew, Vom Ausbau der Bakterien. Mikrobiologischer u. epidemiologischer Anzeiger. Bd 2. Lief. 2. 1922.

2) Der Ausdruck wurde von Van Beneden für Zelleinschlüsse im allgemeinen eingeführt; im gegebenen Falle aber wandte Kitajew ihn vermutlich nur bedingungsweise zum Einschluß des Eiweißcharakters an. (Hertwig, Allgemeine Biologie. 1911. Bd. 2.)

schlich[1]), Kitajew u. a. hört das Chromatin auf, sich zu färben, infolge der Häutchenbildung für die Spore. Dies kann tatsächlich bewiesen werden, wenn das Präparat mit 5proz. Chromsäure bearbeitet und darauf nach Giemsa dauernd (24 Std. lang) gefärbt wird. Dann kann man in vielen sich bildenden und schon reifen Sporen im Innern eigentümlich gefärbtes Chromatin beobachten, das von einem sich mehr oder weniger nicht färbenden Häutchen bekleidet ist. Die Bildung der Spore endet damit, daß ihr Häutchen gegen Säure widerstandsfähig wird. Der andere Kernteil bleibt einige Zeit neben der Spore und geht dann mit der Zelle zugrunde. Paltschikowski[2]) ist der Ansicht, daß das Kernchromatin zuerst je nach der Zellzerstörung die Eigenschaft, sich zu färben, verliert, dann allmählich abnimmt und zuletzt vollständig verschwindet, indem es wahrscheinlich durch die Leibfermente der Bakterien aufgelöst wird.

Bacillus pseudo-anthracoïdes Hueppe.

Bei den Untersuchungen dieser Bazillen benutzte ich, ähnlich wie bei Bac. anthracis, als das Deutoplasma lösendes Reagens $^1/_2$proz. Lösung des Natr. causticum. Nach Fixieren des Präparats vermittels Methylalkohols und Giemsas Färbung erhält man dasselbe Bild, wie beim Milzbrandstäbchen. Jedoch ist zu bemerken, daß Salzsäure das Deutoplasma bei Bac. anthracis und Bac. anthracoïdes Hueppe nicht auflöst, sondern nach deren Einwirkung aufquillt. Bei Färbung dieser Bazillen mit Methylenblau nach Löffler und nach der Bearbeitung mit einer $^1/_2$proz. Salzsäurelösung ist die angequollene Kapsel gut zu sehen; sie ist hellviolett gefärbt, während der Bakterienleib sich blau färbt. Mit Eosin färbt sich die Kapsel gar nicht, während das Zellprotoplasma rot wird. Ein Beweis, daß Kapseln nicht nur bei Bakterien im lebenden Organismus, sondern auch bei solchen auf dem Nährsubstrat vorkommen.

Außer Giemsa-Färbung wurde in diesem Falle auch Hämatoxylin- und Leishmans Färbung angewandt. In beiden Fällen waren in allen Stäbchen Chromatinkörnchen zu sehen, welche hier als Kerne zu betrachten sind, die größtenteils rund, dunkelrot bis violett gefärbt sind. Die rote Farbe trat besonders klar nach Differenzierung mit 20proz. Alkohol hervor, wobei das Protoplasma blaßrosa gefärbt war.

Im erwähnten Falle kann man eigentlich 3 Veränderungsstadien des Kernes beobachten: in den Zellen sehr junger, 4—6stünd. Kulturen erscheinen 1 oder 2 Kerne; in 10- und mehrstünd. Kulturstäbchen zerfällt der Kern in kleine Chromatinkörnchen, die eigentümlich im Zellprotoplasma zerstreut liegen, später aber wieder zusammenschmelzen und 2 Tochterkerne bilden.

Bei der Sporenbildung umgibt der Kernstoff die sich formende Spore von entgegengesetzten Seiten. Diese Erscheinung wird von einigen Autoren als Verbrauch des einen Kernes zur Bildung des Sporenhäutchens angesehen; der andere Kern jedoch hört nach Ansicht derselben Forscher auf, sich zu färben, und verschwindet.

Bacillus subtilis.

Zur Entfernung des Deutoplasmas erwies sich die $^1/_2$proz. Lösung von Natr. causticum als genügend. Nach Giemsas Färbung enthalten

1) Kolle u. Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg. Bd. 2. 1911.
2) Paltschikowski, Einige Beobachtungen über Morphol. und Prozeß der Bakterienvermehrung. Petrograd 1900.

die Stäbchen 1, 2, manchmal auch 3 Kerne, und nur in ganz wenigen Zellen fehlen sie ganz. Sie sind rund, oval oder haben das Aussehen von Geißeln, die quer im Stäbchen liegen. In einigen Stäbchen hatten sich die Kerne wahrscheinlich noch nicht vom Protoplasma absondern können, das Kernchromatin setzte sich hier an den Enden als eine Art rotgefärbter Knäuel oder Fäden an, die die Ränder der Stäbchen begrenzen. In nur wenigen Zellen war Kernteilung zu bemerken, nicht aber Zellteilung. Parallel mit dieser Untersuchung färbte ich auch nach Giemsa die Präparate des Bac. subtilis vor der Behandlung mit Lauge. Das Bild war dasselbe wie bei der Bearbeitung mit Lauge, doch maskierte das in der Zelle vorhandene Deutoplasma den Kern erheblich. Dabei erschien der Kern nicht rot gefärbt, wie beim Chromatin, sondern eher dunkelbraun. Die Körner sind daher nicht als Produkte einer künstlichen Behandlung zu betrachten, sondern als tatsächliche Kerne.

Sarcina.

Zur Erforschung dieser saprophytischen Mikroorganismen wurde eine 24stünd. Kultur mit einer $^{1}/_{2}$proz. Salzsäurelösung behandelt. Die Präparate in den Probegläschen färbten sich nach Fixation und Säureentfernung durch Wasser nach Giemsa in 15—20 Min. Dabei trat in allen einzelnen Kokken deutlich Granulation in Gestalt zweier Linsen hervor, die, einander mit ihren konkaven Flächen zugewendet, ihrer Form nach an Gonokokken erinnerten oder den Eindruck ineinander verschlungener Kerne machten. Diese letztere Erscheinung entspricht vollständig den Angaben Feinbergs[1]), welcher diese Chromatinform der Körner als Körnerteilung ansieht. Auf nicht mit Salzsäure behandelten Präparaten zeigte sich dasselbe Bild, wie es oben beschrieben wurde; Granulation konnte hier in allen Kokken gesehen werden, nur war sie in diesem Falle weniger deutlich. Bei dauernder (24 Std.) Giemsa-Färbung unbearbeiteter Präparate waren einzelne Kokken durchaus gefärbt; bei Differenzierung mit 20proz. Alkohol waren rosa Zellprotoplasma und dunkelviolette, rotschillernde Körnchen zu sehen. Gleichzeitig zeigte sich auf dem der Einwirkung von Salzsäure nicht unterworfenen und mit Pfeiffers Fuchsin gefärbten Präparate totale Färbung; Körnchen waren bei Differenzierung mit Spiritus nicht sichtbar.

Aus diesen Tatsachen ergibt sich die Gewißheit, daß die sich dunkelrot färbenden Körnchen nichts anderes sind als Kokkenkerne. Ihr stetes Vorhandensein in den einzelnen Kokken spricht noch mehr für die Annahme, daß wir es hier mit vollständig morphologisch differenzierten Kernen zu tun haben.

Wir gehen jetzt zur Beschreibung der Ergebnisse über, die wir bei den beiden pathogenen Bakterien, den Schweineseuche-Bazillen und den Rotzstäbchen, erhalten haben:

Bacillus suisepticus.

Der Bacillus suisepticus hat das Aussehen eines Stäbchens, das sich intensiv an den Enden bei Behandlung mit gewöhnlichen Anilinfarben färbt. Nach Behandlung der Kulturen mit $^{1}/_{2}$proz. NaOH und Giemsas Färbung verschwindet die bipolare Färbung und im Zentrum

1) Feinberg, Centralbl. f. Bakt. Bd. 27. 1890.

des Bakterienleibes treten scharf, je nach der Färbungsdauer, dunkelviolette, rotschillernde Körnchen (1, 2 und 3) hervor; mehr wurden in einer Zelle nicht bemerkt. Das Protoplasma färbt sich dabei rosa. Ein besonders klares Bild wurde an 24stünd. Kulturen bei Färbung mit Azur II-Eosin und vorhergehender Behandlung mit schwacher NaOH-Lösung erzielt. Hier treten differenzierte Kerne hervor. In den jüngeren Bakterien war Zellteilung wahrzunehmen. Die Kerne des Bac. suisepticus ließen sich auch mit Hämatoxylin färben. Bei Einwirkung von $^1/_2$proz. Salzsäurelösung auf die Kultur löste sich das Deutoplasma nicht auf, und die Stäbchen hatten bei Giemsa-Färbung dasselbe Aussehen wie bei Färbung mit einfachen Farben. Folglich diente hier die Salzsäure nur als Beizmittel.

Rotzbazillus.

Zum Entfernen des Deutoplasmas zeigte sich eine $^1/_2$proz. Lösung von kohlensaurem Natrium brauchbar. Die Untersuchung einiger Kulturrasen hatte überall dasselbe Resultat. Nach Giemsas Färbung und Behandlung mit 1proz. kohlensaurer Sodalösung zeigten die Stäbchen 1, 2 und sogar 3 Kernchen. Versuche, die Kerne nach vorhergehender Sodabehandlung mit Methylgrün zu färben, gelangen nicht, weil die Lauge in Verbindung mit der Methylgruppe eine Leukoverbindung bildete; nur 1proz. Methylgrünlösung ließ die Kerne vollständig hervortreten, und zwar nach Einwirkung von einer 1proz., durch Essigsäure angesäuerten Salzsäurelösung auf das Rotzstäbchen, also ebenso wie bei Anwendung von Giemsa. Dabei quellen die Bakterien stark auf, was durch Aufquellen der Bazillushülle erfolgt.

Wir teilen hier noch einige Schlüsse mit, die wir nach der Erforschung der beschriebenen saprophytischen und pathogenen Bakterien ziehen dürfen.

In allen Experimenten sahen wir dunkelrot gefärbte Kerne, was eigentlich die charakteristische Farbe für das Kernchromatin ist. Bei intensiverer Färbung der Körnchen werden dieselben fast schwarz; jedoch tritt im letzteren Falle auch hier die rote Nuance ganz klar hervor.

Diese Körner sind auf Grund ihrer Färbung unbedingt als Kerne anzusehen, die denen der anderen Tier- und Pflanzenzellen entsprechen. Weiter sahen wir beinahe in allen Stäbchen Chromatinkörner, die im Zentrum der Zelle oder an deren Enden zu 1, 2 oder 3 und mehr vertreten waren, und nur wenige Stäbchen erwiesen sich als körnerlos. Dies ist wohl dem Umstande zuzuschreiben, daß die Bakterien, indem sie ihre vegetative Eigenschaft verlieren, färbungsunfähig werden. Solche kernlose Organismen sind als abgestorbene Zellen zu betrachten, die Kruse[1]) als Schatten bezeichnen.

Das Vorhandensein der Körner in den Zellen und deren Situationsgleichheit sprechen dafür, daß wir es hier mit Kernen zu tun haben, die denjenigen der Tier- und Pflanzenzellen entsprechen. In einigen jungen Kulturen wurden teilbare Formen mit gleichzeitiger Kernteilung beobachtet, wobei direkte Bakterienteilung wahrscheinlich anzunehmen ist. Miehes[2]) Beobachtungen an Bakterien über die Teilung

1) Zit. nach Kitajew, Ueber den Ausbau der Bakterien. (Mikrobiolog. u. epidemiologischer Anzeiger. Saratow 1922.)

2) Miehe, K., Bakterien. Morphologie. (Zit. nach Justs Botanischer Jahresbericht 1913.)

der Zellkerne bei Bazillus, Bacterium, Azotobacter und Streptococcus) bestätigen dies.

Demnach ist anzunehmen, daß die im ganzen Mikrobenleib zerstreut liegenden Chromatinkörnchen wirkliche Kernbildungen sind. Angenommen, daß diese Körnchen den Chromidien entsprechen, so muß man in der Zellenevolution den Moment suchen, in dem die Chromidien einen gänzlich individuellen Kern vor der Zellteilung bilden. Wir sind daher der Ueberzeugung, daß es keine Mikrobe ohne Kern oder etwas physiologisch Gleichbedeutendes gibt. Diese Tatsachen zwingen uns auch, Haeckels Dogmen kategorisch zu verwerfen, die lehren, daß es niederen Organismen gibt, die keinen Kern oder etwas Dementsprechendes hätten. Und wirklich erklären uns die zytologischen Forschungen die besondere Bedeutung, die der Kern im Funktionieren der lebenden Zelle und der Uebertragung von Familieneigenschaften hat.

Die Ergebnisse dieser Arbeit führen demnach zu folgenden Thesen: 1) Die untersuchten Bakterienarten haben mit den Tier- und Pflanzenzellen vollständig äquivalente Kerne. — 2) Die Kerne der Bakterien färben sich ebenso charakteristisch nach Giemsa, wie die anderer Zellen. Die Kerne der Rotzbazillen lassen sich auch mit Methylgrün färben nach Behandlung mit 1/2proz. Salzsäurelösung. — 3) Die Teilung der Chromatinkörner bei den von uns erforschten Bakterien ist eine Kernteilung. — 4) Das immerwährende Vorhandensein der differenzierten Chromatinbildungen in den Zellen, die Teilnahme an der Kernteilung und die charakteristische Färbbarkeit sind als sicherer Beweis anzunehmen, daß die von uns erforschten Chromatinkörner von den Tier- und Pflanzenzellen vollständig verschieden sind.

Zum Schluß halte ich es für eine angenehme Pflicht, dem hochgeehrten Herrn Professor Pokschyschewski für die Anleitungen bei meiner Arbeit zu danken.

Die Gasbildung in Zuckeragar (hohe Schicht).

[Aus dem Städt. Hygienischen Universitätsinstitut in Frankfurt a. M. (Direktor: Geh. Medizinalrat Prof. Dr. M. Neisser).]

Von Dr. **Emmy Klieneberger.**

Mit 1 Tafel.

Schon Paul Liborius hat in seiner Arbeit: Beiträge zur Kenntnis des Sauerstoffbedürfnisses der Bakterien (1) (1886) ausführliche Versuche mit festen Nährsubstraten — Nährgelatine, Nähragar, Blutserum — in hoher Schicht mitgeteilt. Er hat darin das Sauerstoffbedürfnis der von ihm kultivierten Bakterienarten untersucht und gleichzeitig stets auch die Gasbildung bei Zusatz von Traubenzucker in der hohen Schicht studiert und hat „diese Methode

der höheren Schichten von festen Nährsubstraten außerordentlich brauchbar und lehrreich gefunden..."

Auch M. E. van Ermengem (2) (1896) benutzt Zuckeragar in hoher Schicht (Agar lactosé, glycosé, saccharosé, glyceriné), um die darin stattfindende Gasbildung zur diagnostischen Unterscheidung von Bakterien der Typhus-Coli-Gruppe zu verwerten.

R. Burri spricht (1910) (3) von den von ihm „von jeher bevorzugten Schüttelkulturen".

Auch in den Laboratorien findet die Methode vielfach Verwendung. Es ist auffallend, daß sie trotzdem in den gebräuchlichen bakteriologischen Lehr- und Handbüchern nur beiläufig neben den Methoden mit flüssigen Nährböden erwähnt wird, und nirgends exakte Angaben über ihre Handhabung sich finden. Im „Lehrbuch der Bakteriologie" von L. Heim (1922) (4) steht z. B. nur: „Gewöhnlich begnügt man sich mit der einfachen Stichkultur in Traubenzuckeragar" (S. 547). In der „Technik und Methodik der Bakteriologie und Serologie" von M. Klimmer (1923) (5) wird angegeben: „in die noch flüssigen Nährböden impft man die Bakterien ein, mischt gut durch[1]) und läßt in hoher Schicht erstarren. Bei Gasbildung wird der Nährboden durch Gasblasen mehr oder weniger zerrissen." Die Stichkultur wird in diesem Zusammenhang nicht erwähnt. Warum hier der Schüttelkultur, wie es offenbar geschieht, der Vorzug gegeben wird, ist nicht begründet. Auch im Handbuch der mikrobiologischen Technik von Kraus u. Uhlenhuth (6), Bd. 2. S. 1229, welches den „gebräuchlichsten bakteriologischen Methoden zum Nachweis von Zuckervergärung" einen besonderen Abschnitt widmet, ist die Methode nur kurz erwähnt: Das betreffende Bakterienmaterial wird „in dem verflüssigten und wieder auf mindestens 50° abgekühlten Nährboden gleichmäßig verteilt[1]), worauf die Nährböden zum Erstarren und dann zur Bebrütung gebracht werden. In einem positiven Fall entwickeln sich Gasblasen, die den Nährboden eventuell zerreißen..." Es sei noch die „Bakteriologische Diagnostik" von K. B. Lehmann und R. O. Neumann (7), S. 94, zitiert, die ebenfalls ohne besondere Begründung schreiben: „Zur Prüfung, ob Gas gebildet wird, empfiehlt sich sehr die Schüttelkultur auf 1proz. Traubenzuckeragar." — Auch R. Burri (3) sagt über die Anlegung der Schüttelkultur nur, daß der beimpfte Agar „durch passende Bewegung gründlich gemischt" werden soll.

Die Anführungen zeigen, daß die Methode der Schüttelkulturen hoher Zuckeragarschichten zwar von verschiedenen Seiten empfohlen, daß sie aber weder allgemein anerkannt noch gleichmäßig gehandhabt wird. Besonders bemerkenswert ist es, daß Angaben über die Zuverlässigkeit der Methode fehlen, d. h. über die Bedingungen, die eingehalten werden müssen, wenn konstante Ergebnisse erzielt werden sollen. Trotzdem werden aber aus den somit möglicherweise irrtümlichen Beobachtungen über Gasbildung weitgehende Schlüsse gezogen, die, wenn auch zum großen Teil richtig, so doch nicht ohne weiteres als erwiesen anzusehen sind, zum Teil zweifelhaft, zum Teil auch falsch sind.

Die diagnostische Bewertung der Gasbildung in der Typhus-Coli-Gruppe ist in Deutschland allgemein anerkannt. Nicht anders im Ausland. So weist z. B. in der von ihm herausgegebenen Systematik (8) der Bakterien das „Committee of the Society of American Bacteriologists" der Gasbildung für die Stellung der einzelnen Arten im System ausschlaggebende Bedeutung zu.

Aber wir finden in der Literatur auch die Angabe, daß ein und derselbe Stamm — zu verschiedenen Zeiten geprüft — das eine Mal durch Gasbildung, das andere Mal durch fehlende Gasbildung sich auszeichnet, d. h. also, daß der gleiche Stamm sich in seiner Gasbildung unter scheinbar gleichen Bedingungen variabel verhält. Ein typisches Beispiel hierfür ist der Bac. inconstans (Braun, Ornstein u. Löwenstein, 9, 10, 11), für den geringe und unregelmäßige Gasbildung aus Traubenzucker als Charakteristikum angegeben wird.

Zur Einreihung eines Stammes in eine Systemgruppe sind aber nur konstante Merkmale verwertbar. Wenn es so liegt, daß viele Stämme Zucker vergären oder nicht vergären, ohne daß die Bedingungen für das Auftreten dieser Erscheinung klar erkannt sind, so müssen wir die Zuckervergärung als ein für die Systematik unbrauchbares Merkmal aufgeben.

Von ebenso grundsätzlicher Bedeutung für die Bewertung der Gasbildung sind die sehr zahlreich mitgeteilten Beobachtungen der neu auftretenden Gasbildung

1) Im Original nicht gesperrt gedruckt.

bei einem bisher konstant „gaslosen" Stamm und des Beibehaltens dieser Eigenschaft oder die umgekehrte Beobachtung des dauernden Verlustes des Gasbildungsvermögens.

So berichtet P. v. Engering (12) von der Umwandlung eines Stammes, der aus Traubenzucker Gas bildete und unbeweglich war, in einen Stamm, der sich durch Gaslosigkeit und Beweglichkeit auszeichnete. Aehnlich beobachtete Seligmann (13) „in Gemeinschaft mit Loewenthal einen Paratyphusbazillus, dessen Varianten neben agglutinatorischer Veränderung einen völligen Verlust des Gasbildungsvermögens aufwiesen". Bei der Durchprüfung ihrer Sammlung stellten sie fest, „daß 2 ihrer alten Laboratoriumsstämme .... ihr Gasbildungsvermögen eingebüßt hatten". Seligmann rät daher Vorsicht in der Beurteilung solcher Umwandlungen an: „der sichere Beweis der Artumwandlung steht in diesem Falle noch aus", und fügt bei der Korrektur die Anmerkung hinzu: „daß diese Zurückhaltung das Richtige traf, ergibt sich aus der Tatsache, daß inzwischen eine der 5 aufbewahrten, gaslosen Tochterkulturen wieder Gasbildungsvermögen erworben hat".

Entsprechende Angaben finden sich bei H. Pringsheim (1910) (14) und G. Enderlein (1925) (15) in größerer Zahl.

Um zusammenzufassen: Es liegen vor einerseits hohe Bewertung des Gasbildungsvermögens in diagnostischer Hinsicht, andererseits Angaben über inkonstante Gasbildung (bald so, bald so) sowie häufige Beobachtungen sprunghafter Aenderung dieser Fähigkeit bei demselben Stamm. So ergibt sich die Frage: Darf man dem Gasbildungsvermögen für die systematische Einordnung der Bakterien eine so hohe Bedeutung zumessen, wenn die **Veränderung** dieser Eigenschaft so häufig beobachtet wird?

Man wird diese Frage nicht beantworten können, ehe nicht genaue Angaben über die Technik der Prüfung des Gasbildungsvermögens vorliegen. Die folgenden Untersuchungen beschäftigen sich daher im wesentlichen mit der Methodik der hohen Schicht und haben es sich unter der Voraussetzung, daß manche Unregelmäßigkeiten durch äußere Bedingungen erklärt, durch Einhalten gleichmäßiger Bedingungen zur Regelmäßigkeit gebracht werden könnten, zur Aufgabe gesetzt, solche wechselnden Bedingungen bei Gärungsversuchen[1]) in hoher Agarschicht aufzusuchen.

Die Gesamtheit der Bedingungen, unter denen die Gärung stattfindet, läßt sich in 2 Faktorenkomplexe zerlegen: erstens diejenigen, die durch die Art der Beimpfung, durch das Impfmaterial, ferner die folgende Bebrütung und andere äußere Faktoren, und dann diejenigen, die durch den Nährboden und seine Zusammensetzung gegeben sind. Hiernach lassen sich die Versuche in 2 Hauptabteilungen wiedergeben:

A. Beimpfung, Impfmaterial, äußere Faktoren.

B. Der Nährboden.

Bei der Erörterung der methodischen Fragen werden auch die sich aufdrängenden grundsätzlichen biologischen Probleme behandelt werden.

A. Beimpfung, Impfmaterial, äußere Faktoren.

I. Die Impfmethode.

Als erstes mußte die zur Beurteilung der Gasbildung am besten sich eignende Impfmethode festgestellt werden. Es kamen drei Methoden der Beimpfung in Betracht, nämlich:

1) „Gärung" ist hier und im folgenden gleichbedeutend mit „Gasbildung".

1) Beimpfung der erstarrten „hohen Schicht“ mit der infizierten Nadel; 2) Beimpfung der erstarrten „hohen Schicht“ nach den interessanten Ausführungen von H. Braun und C. E. Cahn-Bronner (16), S. 307, durch Auftropfen von 1—2 Tropfen einer Bakterienaufschwemmung oder Bouillonkultur; 3) Beimpfung des verflüssigten Agars mit der Nadel oder Oese.

Während die erste und dritte Methode zu den gebräuchlichen Laboratoriumsmethoden zählen, ist die zweite sonst nicht üblich. Sie wird von H. Braun und C. E. Cahn-Bronner verwendet zum Studium der Bedingungen, unter denen die Gasbildung erfolgt.

Am einfachsten für den Laboratoriumsbetrieb wäre die 1. oder 2. Methode, da bei ihnen der Agar nicht vor jeder Beimpfung verflüssigt zu werden braucht wie bei der 3. Methode. Aber es handelt sich hier nicht darum, die einfachste, sondern die zuverlässigste Methode zu finden. Diese ist leicht festzustellen: Beimpft man vergleichsweise 3 Traubenzuckeragarröhrchen nach den 3 Methoden mit einem „starken Vergärer“[1]), so ist nach einer etwa 20—24stünd. Bebrütung der Agar in allen Röhrchen durch das gebildete Gas zerrissen. Nimmt man dagegen zu dem Versuch einen „schwachen Vergärer“[1]), so findet man nach der 1. Methode (Stich) manchmal geringe Blasenbildung, häufig aber gar keine Reaktion; nach der 2. Methode (Auftropfen) wurde mit dem „schwachen“ Vergärer niemals Vergärung beobachtet, während die 3. Methode, die der Beimpfung des flüssigen Agars (unter sonst günstigen Bedingungen, auf die später näher eingegangen wird), gleichmäßige und zuverlässige Resultate lieferte. Auch am Beispiel des „starken“ Vergärers läßt sich erkennen, daß die 3. Methode den beiden anderen überlegen ist. Beobachtet man nämlich die Röhrchen während der ersten Zeit der Bebrütung, so sieht man bereits nach etwa 4—6 Std. allein in den flüssig beimpften Röhrchen schon Blasen auftreten, in den anderen aber noch nicht; und nach 8—10 Std. zeigen 3 nach den verschiedenen Methoden beimpfte Röhrchen ein Aussehen, wie es in Fig. 1 wiedergegeben ist.

Es wurde Röhrchen a mit einer Nadel — am Bakterienrasen einer Schrägagarkultur reichlich infiziert — durch Stich beimpft. Röhrchen b ist mit 2 Tropfen einer Aufschwemmung (1 ccm physiol. Kochsalzlösung auf eine Schrägagarkultur) durch Auftropfen beimpft; Röhrchen c ist mit einer Oese derselben Aufschwemmung unter Schütteln beimpft.

Die Figur gibt eine gute Uebersicht über den Wert der 3 Methoden. Der dritten gehört der Vorzug. Aber es muß bei ihrer Verwendung betont und darauf geachtet werden, daß sie nur dann zuverlässig und gleichmäßig arbeitet, wenn die Kultur unter gewissen Kautelen angelegt wird — und zwar als Schüttelkultur! Das Schütteln hat hierbei nicht nur den Zweck, die eingeimpften Bakterien gleichmäßig im Agar zu verteilen, sondern vor allem muß dadurch der

1) Zur Definition dieser relativen Begriffe „starker“ und „schwacher Vergärer“ hier nur so viel, daß ein Bakterium, das sich in seiner Gasbildung verhält wie ein Bact. coli oder wie Paratyphusbazillen, als „starker Vergärer“ bezeichnet wird, während ein Bakterium wie der Bac. inconstans, im folgenden kurz M_2 benannt, und ein zur Friedländer-Gruppe gehörendes Bakt., im folgenden P_{12} benannt, deren Gasbildungsvermögen noch näher geschildert werden wird, als „schwache Vergärer“ bezeichnet werden.

Agar durchlüftet werden. Das Schütteln soll so ausgeführt werden, daß Luftbläschen den flüssigen Agar durchdringen und wieder aufsteigen; 2maliges kräftiges Schütteln, bei dem der Wattepfropfen ruhig mit dem Agar in Berührung kommen darf, reicht hierzu aus. Bei solchem Schütteln erreicht die Gasbildung ein Maximum.

II. Die Bedeutung des Sauerstoffs.

Die Beobachtung der günstigen Wirkung des Schüttelns auf die Gärung führte uns zu der alten Frage, ob der Sauerstoff die Gärung begünstigt, oder ob vielleicht die bessere Verteilung der Bakterien durch das Schütteln oder die Lockerung des Agars die Ursache der besseren Gasbildung sei. Einfache Versuche gaben hierüber Aufschluß. Um den Einfluß der Durchlüftung nochmals genau und gewissermaßen quantitativ festzustellen und die vielleicht nicht immer genügend gleichmäßige Manipulation des Schüttelns auszuschalten, wurde ein völlig gleichmäßiger, langsamer Luftstrom mittels einer einfachen Apparatur durch flüssigen Agar in hoher Schicht (mit geringem Traubenzuckergehalt) bei 45° C hindurchgesaugt. Der Agar war vorher gekocht, um etwa eingedrungene Luft wieder auszutreiben und wurde alsdann nach dem Erstarren von oben mit 2 Tropfen Coli-Aufschwemmung entsprechend den Angaben von H. Braun und C. E. Cahn-Bronner[1]) beimpft. Fig. 2 zeigt drei solche Versuchsröhrchen nach 15stünd. Bebrütung; das erste Röhrchen war 1 Min., das zweite 4 Min., das dritte 10 Min. durchlüftet.

Durch diesen Versuch ist die Begünstigung der Vergärung durch ein gewisses Maß von Durchlüftung sichergestellt. Der folgende Versuch zeigt, daß wirklich der Sauerstoff der Luft der begünstigende Faktor ist. Es wurden vergleichsweise ein langsamer Strom von Kohlensäure und reinem Sauerstoff durch Agar in hoher Schicht mit sehr geringem Zuckergehalt (etwa $^1/_{50}$ Proz.) hindurchgesaugt. Der Agar war vorher ausgekocht und wurde nach dem Erstarren mit 2 Tropfen Coli-Aufschwemmung von oben beschickt.

Es wurde

Röhrchen	**1**	**2**	**Min. lang**	**mit**	**CO_2**	**durchgast**
„	2	10	„	„	„	„
„	3	2	„	„	O	„
„	4	10	„	„	„	„

Die mit Kohlensäure behandelten Röhrchen zeigen hier gar keine Vergärung, ebensowenig wie das 10 Min. lang mit Sauerstoff behandelte Röhrchen; nur das 2 Min. lang mit Sauerstoff durchgaste Röhrchen zeigt Vergärung[2]).

Die Versuche beweisen, daß tatsächlich der Sauerstoffgehalt des Agars die Gärung begünstigt, aber nur bis

1) Ueber die Entstehung der Blasen in der Tiefe der hohen Schicht auch bei Beimpfung von oben vergleiche (16) S. 307.

2) Bei einem Zuckergehalt von 1 Proz. erhält man zwar in allen 4 Röhrchen Vergärung, aber sie beginnt zuerst in Röhrchen Nr. 3 (nach 4 Std.), dann folgt Röhrchen Nr. 4 (nach 6 Std.), und erst nach 15 Std. etwa zeigen auch die mit Kohlensäure behandelten Röhrchen Nr. 1 und 2 Vergärung. Doch bleibt diese auch jetzt noch hinter der Vergärung von Röhrchen Nr. 3 und 4 zurück. Das nur 2 Min. lang mit Sauerstoff durchgaste Röhrchen zeigt stärkste Zerreißung.

zu gewissem Grade; ein zu hoher Sauerstoffgehalt setzt die Vergärung wieder etwas herab. — Die optimale Sauerstoffspannung in der Tiefe der hohen Schicht wird, wie noch viele Versuche [1]) zeigten, durch ein 2maliges kräftiges Schütteln vor oder besser direkt nach der Beimpfung (um gleichzeitig die Keime zu verteilen) erreicht.

In der gleichen Weise wurde die Gärung von Saccharomyces cerevisiae in hohen Schichten (Bierwürzagar) beobachtet, und auch hier die Begünstigung der Gärung durch Einschütteln von Luft nach der Beimpfung konstatiert. Die Gasbildung setzte in den geschüttelten Röhrchen früher ein als in den nicht geschüttelten.

Auch ein Anaërobier, der Bac. putrificus, zeigte eine viel schneller einsetzende und stärkere Vergärung, wenn beim Anlegen der Schüttelkultur reichlich Luftblasen den Agar durchperlt hatten. Ebenso läßt sich bei Tetanusbazillen in der gut durchgeschüttelten Traubenzuckeragarkultur schnelleres und kräftigeres Anwachsen sowie Auftreten einiger Gärblasen beobachten. (Weitere Anaërobier wurden nicht untersucht.)

Es scheint hiernach auch bei Anaërobiern bei dem nur in der Tiefe der hohen Schicht stattfindenden Wachstum durch ein gewisses Quantum Sauerstoff die Gasbildung aus Zucker begünstigt zu werden.

Der Einfluß des Sauerstoffs auf die Gärung ist schon früher hervorgehoben worden. So sagt P. Liborius (1): „Auf Grund genauerer Einzeluntersuchungen mußte jedenfalls sehr bald die Ueberzeugung Platz greifen, daß im entschiedensten Gegensatz zu Pasteurs Ansicht Gärungen existieren, welche durch Sauerstoffzutritt sogar begünstigt werden; so namentlich die alkoholische Hefegärung, die Milchsäuregärung, die Fäulnis durch Rosenbachs Bac. saprogenes.“

Auch R. Burri (3) macht auf die Rolle, die der Sauerstoff bei der Gärung (hier ist die Bildung flüssiger Säure gemeint) spielt, aufmerksam. Burri sucht den Einfluß wechselnden Sauerstoffgehalts (vermutlich durch ungleiche Manipulationen bei der Beimpfung verursacht!) durch anaëroben Verschluß von Zuckerbouillonkulturen auszuschalten, wendet also ein unseren Versuchen entgegengesetztes Verfahren an. Ihm kommt es nur auf Schaffung gleichmäßiger Bedingungen, uns auf gleichmäßige und gleichzeitig günstige Bedingungen an.

Den günstigen Einfluß des Luftsauerstoffs auf den Stoffwechsel der Bakterien, wie wir ihn in bezug auf die Gasbildung feststellen konnten, haben H. Braun und Mitarbeiter in einer Reihe von Untersuchungen erwiesen. Sie haben gezeigt, daß die dauernde Bakterienvermehrung in einer Reihe von einfachen synthetischen Nährlösungen nur bei Luftzutritt (Züchtung der Bakterien in niedriger Flüssigkeitsschicht!) möglich ist: „Je einfacher die Nährstoffe und je geringer ihre Zahl, desto dringender der Sauerstoffbedarf“ (17), S. 1825, (18, 16). Bei der Gärung handelt es sich um einen Prozeß, der auch ohne Sauerstoff vor sich geht, aber er wird durch Sauerstoffzufuhr bis zu einem gewissen Grade begünstigt. In welcher Weise der Sauerstoff hier auf die Gärung wirkt, ob er direkt die chemischen Umsetzungen der Gärung beeinflußt oder ob eine lebhaftere Zellvermehrung einsetzt, läßt

---

1) Die zahlreichen methodischen, hier zusammengestellten Versuche erstreckten sich im ganzen über $1^1/_2$ Jahre.

sich ohne spezielle Untersuchungen nicht entscheiden. Falls ein Analogieschluß von den Untersuchungen mit Hefezellen und über alkoholische Gärung auf die Vorgänge bei der bakteriellen Gärung erlaubt ist, so ist vielleicht die lebhaftere Zellvermehrung der Bakterien bei Sauerstoffzufuhr als Ursache für die reichlichere Gasproduktion anzusprechen; denn nach den Untersuchungen von H. Lundin besteht „bei konstanter[1]) Zellenzahl der Hefe“ .... „kein[1]) Zusammenhang zwischen der Atmung und der Gärung der Hefe und andererseits zwischen der Sauerstoffzufuhr und der Gärung“ (19).

III. Die Impfmenge.

Auf eine weitere Frage wurden wir durch 2 zur Paratyphus-B-Gruppe gehörige Schaf-Abortusstämme hingelenkt. Diese in der Institutssammlung als L_{49} und L_{50} weitergeführten Stämme wurden bei gleichzeitiger Prüfung durch verschiedene Untersucher hier von dem einen als Traubenzuckervergärer, von dem anderen als Nichtvergärer angesprochen. Die Differenz im Ergebnis klärte sich dadurch auf, daß beide Untersucher verschiedene Mengen von Bakterien der Ausgangskultur in die hohe Schicht eingebracht hatten. Und zwar hatte der eine Untersucher eine Oese des Bakterienrasens, der andere dagegen nur eine Oese einer Aufschwemmung (1 ccm physiol. Kochsalzlösung auf eine Schrägagarkultur) verimpft. Schon dieses Beispiel aus dem alltäglichen Laboratoriumsbetrieb zeigt die Bedeutung der **Impfmenge** für die Gärung.

Zur weiteren Aufklärung der Rolle der Impfmenge wurden die folgenden Versuche angestellt. Zunächst (vgl. Fig. 3) wurde die Impfmenge in nachstehender Weise abgestuft:

Röhrchen a wurde mit 3 Oesen Schrägagarkultur,
„ b „ „ 2 „ „
„ c „ „ 1 Nadel „
„ d „ „ 1 Nadelspitze „
„ e „ „ 1 Oese einer Aufschwemmung (2 ccm physiol. Kochsalzlösung auf eine Schrägagarkultur) des Stammes L_{50} beimpft.

Die Abbildung zeigt die Röhrchen nach 24stünd. Bebrütung; im ersten ist die Zerreißung am stärksten, sie nimmt etwas ab im zweiten und dritten, im vierten Röhrchen sind nur einige Gasblasen entstanden, während das letzte Röhrchen keinerlei Gasbildung zeigt.

Bringt man also eine zu kleine Zahl von Keimen (hier waren es bei Röhrchen e immer noch etwa 20 Millionen) in die hohe Schicht ein, so wird man, insbesondere bei nur 1tägiger Bebrütung, ein falsches Urteil über die Gasbildung fällen. — Mehrtägige Bebrütung verschiebt bei dem beschriebenen Versuch das Bild, da dann die Gärung auch in Röhrchen e noch nachkommt.

Dies Ergebnis wird verständlich, sobald man sich die Vorgänge in der hohen Schicht anschaulich vorstellt. Die Zerreißung der Agarsäule ist einer Explosion vergleichbar; es kommt dabei natürlich auf die in der Zeiteinheit gebildete Gasmenge an; diese aber muß in irgendeiner Beziehung zur Zahl der lebenden Keime und ihrer Gasproduktion in der Zeiteinheit stehen.

1) Im Original nicht gesperrt gedruckt.

Bei Züchtung in flüssigen Nährmedien ist die Gasmenge, die eine Bakterienart produziert, unabhängig von der Bakterienmenge, die wir einimpfen. Die neueren Untersuchungen von O. Bail (1925) (20) machen dies Verhalten durch die für die Bakterienarten verschiedenen „M-Werte" der Populationen, d. h. die von Bakterienart und vielleicht auch vom Nährboden abhängigen Maximalzahlen, erklärbar. Jede, auch noch so kleine Bakterienmenge wird sich im flüssigen Nährboden bis zu dieser Maximalzahl vermehren, und die eingeimpfte Bakterienzahl kann daher auf die endgültig gebildete Gasmenge keinen Einfluß haben.

Bei Züchtung in festen Medien (also in hoher Schicht) sind die Verhältnisse wohl komplizierter. Denn es entstehen hier ja Kolonien, deren Zentren sicherlich in der Gasproduktion von der der Peripherie sich unterscheiden. Und die Größe der Peripherie wieder ist von der Größe der Kolonie abhängig; wie groß aber eine Kolonie wird, das hängt, wie jeder Bakteriologe weiß, von der Bakterienart, dem Nährboden und der Dichtigkeit der Beimpfung usw. ab. Während also bei Prüfung in flüssigen Medien die Gasstundenmenge bei einer Bakterienart wohl nur von der Zahl der Keime abhängt, ist bei Züchtung in festen Medien die Gasstundenmenge von der Koloniezahl und der Gasproduktion jeder Kolonie (Gasanstalt) abhängig. — Nach eingetretener Spaltung des Agars werden die Verhältnisse durch ein weiteres Wachstum der Bakterien längs der Spalten noch weiter kompliziert[1]).

Die Bedeutung der Zahl der eingeimpften Keime für die Gasbildung wird besonders anschaulich durch den Versuch der Verimpfung fallender Mengen von Coli-Keimen in Zuckergelatine und Bebrütung bei 20° C. Das erste Röhrchen, mit etwa 50 Millionen Keimen beimpft, zeigte schon nach 20 Std. kleinste, zuerst in der Nähe der Oberfläche auftretende Gärbläschen. Nach im ganzen 30 Std. folgte das zweite Röhrchen, und so setzte stufenweise die Gasbildung in den weiteren Röhrchen ein, bis nach einigen Tagen auch das letzte Röhrchen, das nur mit 2 Keimen beimpft war, in der Nähe der beiden Kolonien 2 Gasblasen aufwies. Fig. 4 zeigt die 3 mit niedrigster Keimzahl beimpften Röhrchen dieses Versuchs, von denen 4a mit 2, 4b mit etwa 20, 4c mit etwa 200 Keimen beimpft war. Die Kolonien sind überall deutlich zwischen den Gasblasen zu erkennen.

Wir sehen: Je größer die Impfmenge ist, desto frühzeitiger setzt die Blasenbildung ein. Aber auch die Quantität des gebildeten Gases ist nach der Impfmenge verschieden. Sie ist um so größer, je reichlicher die hohen Schichten beimpft sind.

Welches ist die Ursache hierfür?: Auch die „M-Zahlen" erreichen in den Röhrchen stärkerer Beimpfung höhere Werte. Um dies zu beweisen, wurde durch vergleichende Keimzählung die Individuenzahl der Populationen in den vergorenen Gelatineschichten auf dem Höhepunkt der Gasbildung zu bestimmen versucht. Es wurde festgestellt, daß die reichlicher beimpften Röhrchen nach Abschluß ihrer Wachstums-

---

1) Auch dadurch können die Verhältnisse, besonders bei längerer Bebrütung, verändert werden, daß auf der feuchten Oberfläche der hohen Schicht ein Bakterienrasen entsteht, und daß von da aus die Bakterien in den Spaltraum zwischen Agarsäule und Glaswand hineinwachsen. [Vgl. H. Braun und C. E. Cahn-Bronner (16), S. 307.]

periode eine größere Zahl lebender Bakterien enthielten als die spärlicher beimpften.

Wir haben also hier ganz andere Verhältnisse wie in flüssigen Nährböden. Denn bei der Gärung in den hohen Schichten ist nicht nur der Zeitpunkt des Einsetzens der Gärung[1]), sondern auch die Quantität des endgültig gebildeten Gases von der Impfmenge abhängig, da hier auch die „M-Zahl", wie wir gesehen haben, eine Funktion der Impfmenge ist.

Die Abhängigkeit der Gasbildung von der Impfmenge wurde noch an einigen im Gärungsgrad sich unterscheidenden Vergärern weiter verfolgt, gleichzeitig wurde hier auch der Einfluß des Nährbodens berücksichtigt. Die anschließenden Tabellen geben solche Versuche mit einem „starken", einem „mäßigen" und einem „schwachen" Vergärer bei Einimpfung fallender Impfmengen wieder. Der „starke" Vergärer ist ein typischer Paratyphus-B-Bazillus, der „mäßige" einer der schon erwähnten Schaf-Abortusstämme (Paratyphus-B-Gruppe) und der „schwache" Vergärer der gleichfalls schon erwähnte Bac. inconstans (Braun, Ornstein und Löwenstein).

Tabelle I.

Paratyphus-B-Bac. Stamm L_{18}.

Impfmenge	Ergebnis nach 1	nach 2	nach 3—6 Tagen
Röhrchen 1 etwa 10 000 Keime	++++ [2])	++++	++++
„ 2 „ 1 000 „	++	++++	++++
„ 3 „ 100 „	+ 2 Gasblasen	++++	++++
„ 4 „ 10 „	—	++++	++++
„ 5 „ 1 „	—	++	++

Es zeigt Tabelle I, daß die Paratyphus-B-Bazillen wie die Coli-Bazillen (beides „starke" Vergärer) auch bei geringer Zahl ursprünglich in die hohe Schicht verimpfter Keime, ja sogar bei Einimpfung nur eines, zu einer isolierten Kolonie auswachsenden Keimes, Blasenbildung hervorrufen, allerdings im letzten Fall erst nach 2 bzw. 3 Tagen (37° C). Im Gegensatz hierzu ruft bei den beiden Schaf-Abortusstämmen, („mäßige" Vergärer), Tab. II, eine unterhalb 50 Keimen gelegene Impfmenge keinerlei Blasenbildung mehr hervor. Die minimale Impfmenge, die eben noch gasförmige Gärung erzeugt, ist hier 50, während sie bei dem schwachen Vergärer, dem Bac. inconstans (Tab. III), sogar 9000 beträgt.

1) Auch in flüssigen Medien setzt die Gärung bei sehr spärlicher Beimpfung etwas später ein als bei reichlicher Beimpfung. Aber nach 36—48 Std. sind die Unterschiede völlig ausgeglichen.

2) Zeichenerklärung für Nabelle I, II, III, IV:
++++ = starke Zerreißung,
+++ = mittelstarke Zerreißung,
>++ = starke Blasenbildung und schwache Zerreißung,
++ = „ „ ohne Zerreißung,
+ = geringe Blasenbildung.

Tabelle II.
Schafabortus-Bac. Stamm L_{49}.

Impfmenge	Endergebnis nach 1	nach 2	nach 3	nach 4—6 Tagen
Röhrchen 1 etwa 50 Mill. Keime	—	++	+++	+++
„ 2 „ 500 000 „	—	—	+++	+++
„ 3 „ 5 000 „	—	—	+++	+++
„ 4 „ 500 „	—	—	+++	+++
„ 5 „ 50 „	—	—	—	+ 2 Blasen
„ 6 „ 5 „	—	—	—	—

Tabelle III.
Bac. inconstans. Stamm M_2.

Impfmenge	Ergebnis nach 1	nach 3—6 Tagen
Röhrchen 1 etwa 90 Mill. Keime	++	>++
„ 2 „ 9 „ „	—	++
„ 3 „ 900 000 „	—	+
„ 4 „ 90 000 „	—	+
„ 5 „ 9 000 „	—	+ 2 Blasen
„ 6 „ 900 „	—	—

Es könnte dieses Verhalten des „schwachen“ Vergärers durch die Annahme erklärt werden, daß die einzelnen Keime der gleichen Herkunft verschieden veranlagt seien. H. Braun und P. Löwenstein (11), S. 4, suchen die unregelmäßige Gasbildung des Bac. inconstans auf diese Weise zu erklären: „Alle Individuen der Kultur des Bac. inconstans sind demnach gleichmäßig befähigt, Traubenzucker unter Säurebildung zu zerlegen“ (es bezieht sich diese Bemerkung auf das gleichmäßige, nach 24 Std. farblose, nach 48 Std. karmoisinrote Wachstum der Kolonien von 4 Inconstans-Stämmen auf Traubenzucker-Endo-Nährböden), „nur einzelne[1]) spalten aber bis zur Gasbildung.“ Nach dieser Auffassung würde unter etwa 50 Keimen des Stammes L_{49} nur 1 Keim die Fähigkeit der Gasbildung besitzen; denn dieser Stamm zeigte in dem angegebenen Versuch nur Gasbildung bei Verimpfung von mindestens 50 Keimen. In gleicher Weise müßte man für den Stamm M_2 annehmen, daß nur etwa jeder 9000. Keim zur Gasbildung befähigt sei. Entsprechend dieser Annahme der verschiedenen Veranlagung der einzelnen Keime eines Stammes wurden 20 Traubenzuckeragarschichten mit etwa 1000 Keimen des Stammes M_2 beimpft, während einige Röhrchen mit der 10fachen Menge von je etwa 10 000 Keimen beimpft wurden. Sämtliche nur mit etwa 1000 Keimen beimpften Röhrchen blieben unvergoren, während in den mit etwa 10 000 Keimen beimpften Röhrchen Gasbildung auftrat.

In einem anderen Versuch betrug die minimale Impfmenge des Stammes M_2: 300, d. h. in mehreren, mit etwa 300 Keimen beimpften Röhrchen trat noch Vergärung auf, während in 20 mit nur etwa 30 Keimen beschickten Röhrchen keine Gasbildung zu beobachten war. Allerdings sind Unregelmäßigkeiten bei solchen Versuchen nicht zu vermeiden. So blieben in demselben Versuch von 20 mit nur etwa 3 Keimen beimpften Schichten nur 19 unvergoren, im 20. war eine Gasblase ge-

1) Im Original nicht gesperrt gedruckt.

bildet. Solche Unregelmäßigkeiten lassen sich wohl dadurch erklären, daß wie schon bemerkt, durch Feuchtigkeit auf der Oberfläche der hohen Schicht (wenn ein oder mehrere Keime auf die Oberfläche gelangt sind) ein Rasen entsteht und die Bakterien dann von oben in den Spaltraum hineinwachsen, während in den Parallelröhrchen nur einige isolierte Kolonien entstehen. — Aus solchen einmal ausnahmsweise vergorenen Röhrchen ließ sich niemals ein nun etwa besser vergärender Stamm herauszüchten, sondern ein solcher Stamm verhielt sich ebenso wie der Ausgangsstamm.

Nach diesem Ausfall des Versuchs ist es unwahrscheinlich, daß die einzelnen Keime verschiedenes Gasbildungsvermögen besitzen. Es hätte sonst auch in den 20 mit 1000 bzw. 300 Keimen beimpften Röhrchen etwa 2mal Gasbildung beobachtet werden müssen. Es wird also die Gasbildung in den Röhrchen stärkerer Beimpfung nicht durch verschiedene Veranlagung einzelner Keime erklärt werden können. Vielmehr wird die M-Zahl in den Röhrchen stärkerer Beimpfung größer sein als in den Agarschichten mit geringerer Beimpfung. Es wird daher im ersten Fall eine größere Gasstundenmenge produziert als im zweiten. Diese Gasstundenmenge führt im ersten Fall zur Explosion, im zweiten Fall ist sie zu klein, um eine Explosion hervorrufen zu können.

Nachdem — wie im folgenden noch dargestellt werden wird — die Abhängigkeit der Gasbildung von den Nährbodenverhältnissen ausführlich studiert worden war, hatten wir noch weitere Möglichkeiten, um die Annahme der gleichen Befähigung der verschiedenen Keime gleicher Herkunft für die Gasbildung zu stützen.

Gestalten wir nämlich die Nährbodenverhältnisse günstiger[1]), so können wir auch bei den „schwachen" Vergärern erreichen, daß Blasenbildung eintritt, wenn überhaupt noch Wachstum sich zeigt (ebenso wie bei den „starken" Vergärern). Dies erläutert Tab. IV, die noch einen mit dem Bac. inconstans ange-

Tabelle IV.

Bac. inconstans. Stamm M_2 (optimaler Nährboden).

Impfmenge	Ergebnis nach 1	nach 3—6 Tagen
Röhrchen 1 etwa 10 Mill. Keime	>++	>++
„ 2 „ 100 000 „	+	>++
„ 3 „ 1 000 „	—	>++
„ 4 „ 100 „	—	>++
„ 5 „ 10 „	—	+
„ 6 einige „	—	+

stellten Versuch unter optimalen Gärungsbedingungen wiedergibt. Es tritt Gasbildung noch im letzten bewachsenen, nur mit einigen Keimen beimpften Röhrchen ein.

1) Die in Tabelle I u. II wiedergegebenen Versuche wurden mit dem im Institut üblichen Gebrauchsagar (d. h. Plazentawasser mit Zusatz von 0,25 Proz. Fleischextrakt, 1 Proz. Pepton und 1 Proz. Traubenzucker) angestellt. Die in Tab. III angegebenen, sowie die zuletzt geschilderten Versuche wurden mit demselben Agar, aber einer für M_2 günstigen Wasserstoffionenkonzentration (pH = 7,4) ausgeführt. Die letzte Versuchsreihe, Tab. IV, wurde mit Fleischwasseragar und Zusatz von 1 Proz. Pepton sowie 1 Proz. Traubenzucker, pH = 7,4, angestellt.

Die Ursache hierfür ist wohl in der stärkeren Vermehrung (größere Kolonien) der wenigen Keime, die durch den günstigeren Nährboden bedingt ist, zu suchen.

Trotzdem bleibt auch bei Verwendung optimaler Gärungsnährböden ein deutlicher Unterschied zwischen dem „schwachen" und „starken" Vergärer bestehen: Auch unter den günstigsten Gärungsbedingungen ist die Gasstundenmenge (die Heftigkeit der Explosionen) beim „schwachen" Vergärer kleiner (vgl. die Tabellen) als beim „starken".

Uebereinstimmend hingegen prägt sich der Einfluß der Impfmenge bei „schwachen" und „starken" Vergärern darin aus, daß mit fallender Impfmenge die Gärung verzögert in Erscheinung tritt und daß die Quantität der Gasmenge, entsprechend kleineren „M-Zahlen", abnimmt.

Verwenden wir aber nicht-optimalen Nährboden für die schwachen Vergärer, so summieren sich bei geringer Beimpfung dreierlei gärungshemmende Faktoren: der schlechtere Nährboden setzt die M-Zahl herab, die schwache Beimpfung wirkt in der gleichen Richtung, hierzu kommt schließlich noch die an sich schon geringere Gasproduktion des „schwachen" Vergärers in der Zeiteinheit. Die Folge ist, daß bei einer unter eine Minimalzahl sinkenden Impfmenge Gasbildung nicht mehr beobachtet werden kann.

IV. Beschaffenheit des Impfmaterials.

Weitere wichtige Gesichtspunkte erwachsen aus der Beantwortung der naheliegenden Frage nach dem Alter der Kultur und vor allem dem Einfluß von Passagen auf die Gasbildung. Auf das Alter der Kulturen näher einzugehen, erübrigt sich, da es eine alte Erfahrung ist, daß frische, neu überimpfte Kulturen lebhafter reagieren und eine größere Aktivität in allen Stoffwechselvorgängen aufweisen. So ist wohl anzunehmen, daß sie besser vergären, und demgemäß zu fordern, daß man zur Prüfung der Gasbildung nur frisch überimpfte Kulturen verwenden soll. Größere Bedeutung verdient die Würdigung des Einflusses von Passagen. Bei den meisten Stämmen ließ sich ein solcher Einfluß nicht nachweisen. Sie bildeten gleichmäßig Gas, unabhängig davon, ob sie nur einmal oder mehrmals hintereinander frisch überimpft waren. Wesentlich dagegen war der Faktor der Passagenwirkung bei dem Bac. inconstans M_2. Dieser erreichte eine maximale und dann gleichmäßige Fähigkeit der Gasbildung erst nach 10—20 Passagen, wenn als Ausgangskultur der alte Sammlungsstamm benutzt wurde, der nur alle 2—3 Monate überimpft wird. Durch noch weitere Passagen ließ sich die Gärfähigkeit nicht mehr steigern. Diese Beobachtung des Einflusses von Passagen auf den Stamm M_2 wurde im Laufe von etwa $1^1/_2$ Jahren wiederholt gemacht; auch jetzt wieder, nachdem mit dem Stamm $1^1/_2$ Jahre lang experimentiert worden war, zeigte eine Kultur, die 3 Monate lang nicht überimpft wurde, das gleiche Verhalten wie die ursprüngliche Ausgangskultur. Nach einmaliger Ueberimpfung auf Schrägagar in 6 Traubenzuckeragarschichten von optimaler Zusammensetzung überimpft, tritt auch nach längerer Bebrütung keinerlei Gasbildung auf. Dagegen wird nach 10 Passagen unter günstigen Gärungsbedingungen regelmäßig Gas gebildet. In seinen Besonderheiten hat sich also der Stamm M_2 im Laufe von $1^1/_2$ Jahren als konstant erwiesen.

Es kann also die Anzahl aufeinander folgender frischer Ueberimpfungen für die Gasbildung eine Bedeutung haben.

V. Aeußere Faktoren während der Bebrütung.

Zu ihnen gehört vor allem die Temperatur, bei der sich Wachstum und Gärung abspielen. Es liegt nahe, anzunehmen, daß es bestimmte optimale Gärungstemperaturen gibt, die unter Umständen für einzelne Bakterienarten erst besonders bestimmt werden müssen.

Versuche hierüber wurden nur wenige angestellt. Von den untersuchten Stämmen bildeten die Coli-Bazillen auch bei Zimmertemperatur reichlich Gas, während die beiden Schaf-Abortus-Stämme und der Bac. inconstans M_2, der bei Zimmertemperatur gut wächst, hier keine Gasbildung zeigte.

Auch die Zeit der Bebrütung ist, wie bereits angegeben, wichtig: Es kann die Gärung noch am 2. oder 3. Tage einsetzen, besonders dann, wenn die eingeimpfte Keimmenge gering ist. Eine 5tägige Bebrütung der „hohen Schichten" (Brutschranktemperatur) genügt aber stets, da, wenn bis dahin Gärung nicht eingetreten war, auch nach längerer Zeit in keinem Fall mehr Veränderungen beobachtet wurden.

B. Der Nährboden.

Der Komplex der Bedingungen, die durch die Zusammensetzung des Nährbodens gegeben sind, läßt sich mit „starken" Vergärern wie Coli-Bazillen, deren Ansprüche an den Gärungsnährboden nur gering sind, schwer feststellen. Deshalb wurden zu diesen Untersuchungen neben starken Vergärern, die immer als Vergleichsobjekte dienten, vor allem „schwache Vergärer" — und zwar die Stämme M_2 und P_{12} — herangezogen.

Ehe auf diese Versuche eingegangen wird, muß auf die Vorsichtsmaßregeln hingewiesen werden, die bei der Herstellung von Zuckeragar unbedingt erforderlich sind, falls einwandfreie Ergebnisse erzielt werden sollen.

I. Die Herstellung von Zuckeragar.

Wie bekannt, dürfen Zuckerlösungen nur kurze Zeit sterilisiert werden, da sie sich in der Hitze zersetzen. Nach den meisten Lehrbüchern soll die kurz sterilisierte Zuckerlösung dem bereits fertigen Nährboden zugesetzt werden (6), S. 568. Im hiesigen Institut ist es üblich, konzentrierte Zuckerlösungen herzustellen (die Traubenzuckerlösung 50proz., die Milchzuckerlösung 25proz.) und an 2 Tagen hintereinander etwa 5 Min. lang zu sterilisieren; am dritten Tag werden sie dem flüssigen Nähragar zugesetzt, und der Zuckeragar nochmals kurz aufsterilisiert. Dadurch ist noch keine Schädigung zu befürchten. Wird dagegen Traubenzuckerlösung, bzw. Traubenzuckernähragar längere Zeit gekocht (über $1/2$ Std. und mehr), und dann die Gärung in hoher Agarschicht z. B. durch Paratyphus-B-Bazillen geprüft, so zeigt sich die Gasbildung vermindert. Die Gärung ist um so geringer, je länger der Zucker erhitzt wurde.

Milchzuckerlösung, die längere Zeit erhitzt wurde, spaltet bekanntlich Traubenzucker ab. Prüft man traubenzuckerfreien Milch-

zuckernähragar, der einige Zeit gekocht wurde, mit einem Traubenzuckervergärer, der Milchzucker nicht angreift (also z. B. wieder mit Paratyphus-B-Bazillen), so erweist sich die Gasentwicklung (von einigen Gasblasen an bis zur völligen Durchsetzung des Agars mit Blasen und mehr) um so stärker, je länger der Zucker erhitzt worden ist.

Aber auch wenn der Zucker einwandfrei behandelt wurde, kann man gerade bei Prüfung der Milchzuckervergärung leicht zu Trugschlüssen verleitet werden, denn selbst Milchzuckeragarnährboden ohne nachweisbaren Traubenzuckergehalt ist in fertigem Zustande nur kurze Zeit (oft nur einige Tage bis zu einer Woche bei Aufbewahrung bei Zimmertemperatur) verwendbar[1]); man findet dann, und zwar, wie betont, nach verschiedenen Zeiten[2]), wieder Traubenzucker — erkennbar daran, daß Paratyphus-B-Bazillen nunmehr Gasblasen bilden.

Die sterile 25proz. Milchzuckerlösung ist dagegen lange haltbar, ohne sich zu zersetzen. Nach $^1/_2$ Jahr zeigte sie noch keine Veränderung. Es empfiehlt sich deshalb für exakte Untersuchungen, dem entzuckerten (s. später) Agarnährboden nach der Verflüssigung unmittelbar vor dem Beimpfen einige Tropfen steriler Milchzuckerlösung zuzusetzen, die man, in kleinen Mengen abgefüllt, vorrätig hält.

Wir sind mit den Vorsichtsmaßregeln noch nicht zu Ende: Die Herstellung von Agarnährböden ohne Beimengungen von Traubenzucker (oder in der Vergärfähigkeit ähnlichen Kohlehydraten) muß noch besprochen werden. Bekanntlich enthält der gewöhnliche Nähragar immer geringe Mengen von Traubenzucker [von Spuren bis zu 0,3 Proz. nach Theob. Smith (21)]. Der in unserem Institut gewöhnlich verwendete Nähragar enthält durchschnittlich etwa $^1/_{50}$ Proz. Traubenzucker, der zum kleineren Teil aus dem die Grundlage bildenden Plazentawasser, zum größeren Teil aus dem selbstbereiteten Pepton [nach W. Frieber (22)] stammt. Fleischwasser enthält einen noch größeren Prozentsatz an Traubenzucker, durchschnittlich etwa $^1/_{10}$ Proz. Die von uns untersuchten Proben des „Witte-Peptons" hatten keinen durch Bakterien nachweisbaren Traubenzuckergehalt. Ebenso war der „Liebig-Fleisch-Extrakt" der „Liebig-Gesellschaft m. b. H., Köln", zuckerfrei.

Es mag noch einmal ausdrücklich hervorgehoben werden, daß unsere Bestimmungen des Traubenzuckers ausschließlich auf der Vergärung durch geeignete Bakterien beruhten, und daß auch unsere quantitativen Ergebnisse nur auf diesem Wege gewonnen worden sind, aber wir benutzen die Gelegenheit, auf diese einfache und genügend genaue quantitative Methode hinzuweisen.

Zur Entfernung des störenden Zuckers aus der Bouillon bzw. dem Fleischwasser werden verschiedene Verfahren angegeben, so die Vergärung des Zuckers durch Bierhefe während einer Nacht im Brutschrank (23); ferner die Beimpfung mit Bact. coli während 24 Std. (nach Th. Smith) (6), S. 569, und schließlich Herstellung eines Fleischwassers aus Fleisch, das tagelang bei 10—13° gehangen hat (Péré, Spronck) (6), S. 568 u. (24). Auch soll das Fleisch schlecht genährter (tuberkulöser) Rinder nach Smith (6), S. 568, auch ohne besondere Vorbehandlung völlig zuckerfrei sein.

---

1) Im Eisschrank ist er längere Zeit haltbar (14 Tage bis 4 Wochen).
2) Nach 14 Tagen bis 3 Wochen ist bei Aufbewahrung bei Zimmertemperatur fast regelmäßig Traubenzucker gebildet.

Wir bedienten uns in der Regel des zweiten Verfahrens, das Th. Smith zum Urheber hat.

Die Bouillon oder nur das Fleischwasser wurden mit Bact. coli beimpft und 24—48 Std. bei 37° C unter ein- bis zweimaligem kräftigen Umschütteln bebrütet. Der aus solcher entzuckerter Bouillon (bzw. Fleischwasser unter Peptonzusatz) hergestellte Agarnährboden ergab nach unseren oft wiederholten Prüfungen keine Gasbildung nach Beimpfung mit Traubenzuckervergärern. Der Angabe von E. Gildemeister (6), S. 569: „Nährböden, denen Agar zugesetzt ist, lassen sich nicht völlig zuckerfrei herstellen, da beim Kochen des Agars . . . stets geringe Mengen Zucker abgespalten werden", müssen wir daher widersprechen. Nur insofern trifft die Angabe Gildemeisters zu, als ein Nähragar, der nach unserer Prüfung völlig zuckerfrei war, auf die Dauer nicht zuckerfrei bleibt. Nach 4—6 Wochen kann er wieder durch Bakterien nachweisbaren Zucker abgespalten haben. Etwa 4 Wochen lang war er aber nach unseren Prüfungen stets brauchbar, wenn er bei Eisschranktemperatur aufgehoben wurde, auch länger.

Auch durch Beimpfung mit Saccharomyces cerevisiae und Bebrütung kann man den Zucker aus der Bouillon genügend entfernen. Agarnährboden, den wir aus solcher „Hefebouillon" herstellten, erwies sich als ebenso brauchbar wie solcher aus „Coli-Bouillon".

Dagegen konnten wir mit abgehängtem Fleisch, selbst wenn die Zersetzungsvorgänge durch üblen Geruch sich ankündigten, keine genügend zuckerfreien Nährböden erhalten.

Péré (6), S. 569, gibt an, daß Bakterien, die Traubenzucker angreifen, in Nährböden aus altem Fleisch keine Säuerung mehr hervorrufen. Trotzdem ist aber noch so viel Zucker vorhanden, daß Traubenzuckervergärer in der hohen Agarschicht Gasblasen erzeugen können. Die Methode des Zuckernachweises durch die Gasbildung von Traubenzuckervergärern in der hohen Schicht ist schärfer als die Bestimmung der von den Bakterien aus dem Zucker gebildeten Säure in flüssigen Nährböden.

Folgende Methode zur Prüfung der Milchzuckergärung in der hohen Schicht wird nach den vorausgegangenen Erörterungen empfohlen:

Man verwende entzuckerten Agarnährboden, hergestellt aus Coli- oder Hefebouillon, der höchstens 4 Wochen alt ist (aufbewahrt im Eisschrank). Den verflüssigten hohen Schichten setze man sterile Milchzuckerlösung zu. Zur Kontrolle beimpfe man gleichzeitig eine hohe Schicht, ohne Milchzuckerzusatz. In dem Kontrollröhrchen darf durch Bebrütung keine Gasblase entstehen.

Will man sich noch von der Reinheit des verwendeten Milchzuckers überzeugen, so beimpfe man auch noch eine Milchzuckeragarschicht mit einem Traubenzuckervergärer, der Milchzucker nicht angreift.

Auch bei Untersuchung der Gasbildung aus anderen Zuckerarten und Kohlehydraten, z. B. aus Glyzerin, sind dieselben Vorsichtsmaßregeln notwendig. Wie leicht sonst falsche Diagnosen möglich sind, zeigen die Untersuchungen von E. van Ermengem (2). Dieser sonst so feine Beobachter konstatierte in hohen Agarschichten bei einer Reihe von Fleischvergiftern, also Bakterien der Paratyphus-B-Gruppe, Gasbildung aus Milchzucker, Glukose, Saccharose und Glyzerin. Diese zum großen Teil unzutreffenden Ergebnisse konnten nur

durch Verwendung von Nährböden mit täuschendem Traubenzuckergehalt gewonnen sein.

Nachdem wir uns so über die Anforderungen, die an den Agar gestellt werden müssen, klar geworden waren, suchten wir die Frage zu beantworten, in welcher Weise die Vergärung, insbesondere der schwach vergärenden Stämme, durch Veränderung der Milieu-Zusammensetzung gesteigert werden könnte. Zur Methodik sämtlicher im folgenden erwähnten Versuche ist zu bemerken, daß stets frische eintägige Kulturen verwendet wurden, die vor der Beimpfung der hohen Schichten mit 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt wurden. Von dieser Aufschwemmung wurde 1 große Oese in die hohe Schicht bei 45° C eingebracht und zweimal kräftig geschüttelt. Der Zuckerzusatz betrug in der Regel 1 Proz. Ein Agarnährboden von 2,5 Proz. Agargehalt erwies sich uns am günstigsten zur Beobachtung der Gasbildung.

II. Die Wasserstoffionenkonzentration.

Um eine Verstärkung der Gasbildung zu erzielen, wurde als erster Faktor die Wasserstoffionenkonzentration variiert. Es wurde zunächst Bact. coli in Traubenzuckernähragar untersucht und festgestellt, daß eine Wasserstoffionenkonzentration von $p_H = 7,4$ bis 7,6 besonders günstig zur Erzielung maximaler Gasbildung ist. Abweichungen vom Optimum nach der sauren Seite sind für die Gärung ungünstiger als Abweichungen nach der alkalischen Seite. Ein Zusatz von 5 Tropfen n/HCl zu 10 ccm unseres neutralen Traubenzuckernähragars hemmte die Gärung schon fast vollständig. Es entspricht dies $p_H = 5$.

Von ganz besonderer Bedeutung ist die p_H-Konzentration bei den schwachen Vergärern. Der Bac. inconstans (Braun, Ornstein und Löwenstein) (5), der bald schwach, bald gar nicht vergären soll, zeigte auch bei uns, solange wir mit dem bei uns üblichen zur Herstellung des Zuckeragars verwendeten Gebrauchsnähragar[1]) arbeiteten, das beschriebene unbeständige Verhalten. Hier konnten wir aber bei Variierung der Wasserstoffionenkonzentration feststellen, daß bei neutraler oder gar schwach saurer Reaktion im „Gebrauchsnähragar" meist keinerlei Vergärung auftritt. Das Optimum der p_H-Konzentration liegt für den Stamm M_2 bei 7,4—7,6. Bei $p_H = 7,4$ findet schon im „Gebrauchsagar" eine immer gleichmäßige Vergärung in Form starker Blasenbildung bis zu schwacher Zerreißung statt, falls man, wie früher angegeben, eine Reihe von Passagen mit dem Stamm über gewöhnlichen Schrägagar vorgenommen hat. Man kann also die Gasbildung des Bac. inconstans aus Traubenzucker nur mit Einschränkung als inkonstant bezeichnen; denn die Einhaltung einer konstanten optimalen Wasserstoffionenkonzentration genügt, um mit diesem Stamm nach Passagen über Schrägagar regelmäßig Gasbildung aus Traubenzucker zu erzielen. Ein solcher täglich frisch überimpfter Stamm behielt seine Fähigkeit der Gasbildung in Nähragar mit optimaler $[H^{\cdot}]$ dauernd un-

1) Der übliche Gebrauchsnähragar wird aus Plazentawasser mit Zusatz von 0,25 Proz. Fleischextrakt und 1 Proz. Pepton hergestellt.

verändert bei. Nur in Agarnährböden von verschiedenem [H˙] verhielt er sich scheinbar inkonstant.

Das Gärungsoptimum der [H˙] liegt bei $p_H = 7{,}4$ bis 7,6. Während also für das Wachstumsoptimum der meisten Bakterien eine schwach alkalische Reaktion, etwa 7,2—7,3 angegeben wird, so liegt das Gärungsoptimum des Bac. inconstans und ebenso der Coli- und Paratyphus-B-Bazillen bei einer etwas alkalischeren Reaktion. Dieses Gärungsoptimum ist eine Konstante, wie die wiederholten Untersuchungen im Laufe von $1^1/_2$ Jahren bewiesen.

Es taucht die Vermutung auf, daß das Alkali die aus dem Zucker zunächst gebildete Säure neutralisiert, und daß so die Spaltung des Zuckers länger fortgesetzt werden kann und daher auch eine reichlichere Gasbildung einsetzt. Wir wissen ja schon aus den Versuchen von Th. Smith (21), wie empfindlich Bakterien gegen Säurebildung aus Zucker sein können. Neuerdings hat K. Scheer (25) wieder gezeigt, daß in Zuckerbouillon durch das Wachstum von Bact. coli Wasserstoffionenkonzentrationen erreicht werden können, durch welche die Coli-Bakterien sich selbst abtöten.

Um diese Vermutung zu prüfen, wurde versucht, ob Zusatz eines Puffers erhöhte Gasbildung zur Folge hat. Als Puffer wurde ein Sörensensches Gemisch von sekundärem Natriumphosphat und primärem Kaliumphosphat benutzt, und zwar wurden auf 10 ccm Agar

$$0{,}1575 \text{ g } Na_2HPO_4 \cdot 2\, H_2O$$
$$+\ 0{,}0157 \text{ g } KH_2PO_4$$

zugegeben. Dieses Gemisch besitzt die Stufe 7,6 und geht bei Entwicklung von 1,5 ccm n/10-Säure[1]) auf Stufe 7,2.

Es wurde festgestellt, daß Coli- und Paratyphus-B-Bazillen bei Zugabe dieses Phosphatgemisches besonders stark Gas entwickeln: Der Wattestopfen wurde aus dem Reagenzröhrchen herausgetrieben, was sonst nicht eintrat. Bei dem Stamm M_2 blieb mit Pufferzusatz die Gasbildung am 1. und 2. Tag zurück, am 3. und 4. Tag setzte sie kräftig ein; sie übertraf aber die der Kontrollröhrchen nicht oder nicht bemerkenswert. Hieraus könnte man schließen, daß, obwohl die Beigabe des Puffers durch Neutralisation der gebildeten Säure günstig wirkt, die hohe Phosphatkonzentration des Nährbodens (fast 1,7 Proz.) den schwachen Vergärer zunächst hemmt. Es läßt sich aber durchaus nicht annehmen, daß bei den „schwachen" Vergärern nur eine erhöhte Säureempfindlichkeit vorliegt, und daß man sie durch Neutralisation der Säure zu starken Vergärern machen könnte. So einfach sind die Verhältnisse sicher nicht; ein Faktor beispielsweise, der hier, wie wir früher sahen, eine Rolle spielt, ist das Wachstum und die „M-Zahl" in der hohen Schicht.

Auch liegt das Gärungsoptimum der Reaktion nicht immer auf der alkalischen Seite. Das zeigt das Beispiel eines anderen, schwachen Vergärers, des schon erwähnten zur Friedländer-Gruppe gehörenden Stammes P_{12}.

Dieser Stamm fiel dadurch auf, daß er bei mehreren Prüfungen eine schwache Milchzuckervergärung, aber keine Traubenzuckergärung aufwies. Da wohl alle Bakterien, die aus Milchzucker Gas bilden, auch

1) Diese Säurequantität wird mindestens von starken Traubenzuckervergärern in 1—2 Tagen in 10 ccm Zuckeragar gebildet.

Traubenzucker vergären [1]), so standen wir von Anfang an diesem Prüfungsergebnis mißtrauisch gegenüber; es zeigte sich dann auch, als eine neue Nummer „Gebrauchsagar" zur Verwendung kam, daß P_{12} auch ein „schwacher Traubenzuckervergärer" ist.

Das merkwürdige Ergebnis der ersten Prüfung klärte sich bei Untersuchung der für P_{12} günstigen Wasserstoffionenkonzentration auf. Es ergab sich nämlich als optimale pH-Konzentration die Stufe 6,8. Wir haben also einen Fall, bei dem eine schwach saure Reaktion für die Gärung günstiger ist als eine alkalische.

Da nun für den „Gebrauchsagar" des Instituts die pH-Konzentration 7,2—7,4 vorgeschrieben ist, so braucht man nur anzunehmen, daß bei der 1. Prüfung der Traubenzucker- und Milchzuckernähragar nicht von derselben Herstellungsnummer unseres „Gebrauchsagars" stammte, und daß der Traubenzuckernähragar die pH-Konzentration 7,4, der Milchzuckernähragar die pH-Konzentration 7,2 oder noch weniger hatte; und damit ist das paradoxe Ergebnis aufgeklärt.

Es war also bei P_{12} gelungen, den im gewöhnlichen Agar nur schwach und unregelmäßig aus Traubenzucker Gas abspaltenden Stamm durch günstige Reaktion als konstanten Traubenzuckervergärer zu erweisen. Besonders interessant war es, festzustellen, daß die für diesen Stamm „optimale Gärungsreaktion" eine schwach saure ist, obwohl er auch auf alkalischen Nährböden sich durch üppiges Wachstum und reichliche Schleimbildung auszeichnet.

Es wurden auch mit P_{12} Versuche mit dem Sörensenschen Phosphatgemisch angestellt. Der Puffer hat hier keinerlei Einfluß, weder in gärungsförderndem noch hemmendem Sinn.

Viel weniger empfindlich als Bakterien sind Hefen gegen Aenderung der Reaktion. Besonders widerstandsfähig sind sie gegen Säuren. So gärt Bierhefe noch in hoher Bierwürzagarschicht bei einem Gehalt von 3 Proz. Zitronensäure, während Coli-Bazillen in einer mit 1 Proz. Zitronensäure versetzten Bouillon in 24 Std. absterben. Auch bei Zusatz von Alkali wird die Gärung länger aufrecht erhalten als bei Bakterien. Bei Zusatz von 1 ccm n-Sodalösung zu 9 ccm Bierwürzagar wird in der hohen Schicht noch Gas gebildet.

Als Hauptergebnis der Versuche über die Wasserstoffionenkonzentration soll hervorgehoben werden, daß sich für die einzelnen Stämme optimale Wasserstoffionenkonzentrationen feststellen lassen. Einhaltung dieser Reaktion genügte bei beiden zuerst als unregelmäßig imponierenden Stämmen zur Erzielung konstanter gleichmäßiger Gärung. Besonders beachtenswert ist hierbei, daß die optimale Reaktion einzelner Stämme verschieden ist, so daß sie unter Umständen gesucht werden muß, ehe ein Urteil über die Gärfähigkeit ausgesprochen werden kann. Es ist zu beachten, daß bei zwei Untersuchungen desselben Stammes, die zeitlich auseinanderliegen, mit der Möglichkeit verschiedener Wasserstoffionenkonzentrationen gerechnet werden muß; davon allein aber kann das Versuchsergebnis abhängen.

Nachdem die Frage der Reaktion geklärt war, gingen wir daran, die andern im Nährboden den Bakterien dargebotenen Bedingungen zu

1) Eine Ausnahme soll der Bac. aërogenes Wortmanns machen (26), S. 301.

variieren. Wir suchten über die Bedeutung verschiedener Stickstoffquellen für die Gärung eine Vorstellung zu gewinnen.

III. Bedeutung der stickstoffhaltigen Substanzen.

Gebräuchliche Nährbodenbestandteile: Fleischwasser, Plazentawasser, Fleischextrakt, Pepton.

Es wurden die gebräuchlichen eiweißhaltigen Substanzen der bakteriologischen Nährböden geprüft. Zu diesem Zwecke wurde zunächst ein Wasseragar hergestellt aus destilliertem Wasser ohne jeden weiteren Zusatz. Der Agar war 5 Tage lang gewässert worden zur Entfernung der geringen Beimengungen, welche anspruchslosen Bakterien zum Wachstum genügen können (16), S. 228. In dem so hergestellten Wasseragar (der immer noch Spuren fremder Substanzen enthalten kann) vermochten weder Coli- noch Paratyphus-B-Bazillen bei Zusatz von Traubenzucker sich zu vermehren, es konnte also auch keinerlei Gasbildung auftreten. Dieser Agar soll im folgenden kurz als A-d-Agar (Aqua-dest-Agar) bezeichnet werden. Zweitens wurde ein Agar aus Plazentawasser (1 Plazenta auf 1 l dest. Wassers), Pl.-Agar bezeichnet, und schließlich ein Agarnährboden aus Fleischwasser (1 Pfund Fleisch auf 1 l dest. Wassers), Fl.-Agar bezeichnet, ohne sonstige Zusätze hergestellt. Da ein besonderer Kochsalzzusatz sich bei den benutzten Nährböden als einflußlos auf die Gärung erwies, wurde er bei sämtlichen im folgenden angegebenen Versuchen weggelassen[1]). Den 3 verschiedenen Agarnährböden wurde außer 1 Proz. Traubenzucker zunächst Pepton in steigenden Mengen von 1/100 bis 3 Proz. zugesetzt. Dann wurde als weiterer häufig verwendeter Nährbodenzusatz Fleischextrakt (Liebig und System Liebig) geprüft, indem er in ebenfalls steigenden Mengen von 1/10 bis 1 Proz. den 3 Nährböden zugegeben wurde. Schließlich wurde eine Kombination von Pepton und Fleischextrakt untersucht. Selbstverständlich wurde immer eine für die betreffende Bakterienart optimale Wasserstoffionenkonzentration hergestellt.

Als Testbakterien dienten die „schwachen Vergärer": M_2, P_{12} und außerdem Coli- und Paratyphus-B-Baillen.

Die im folgenden beschriebenen Versuche mit Pepton und Fleischextraktzusätzen sind in kurzer Uebersicht in Tabelle V zusammengestellt. Im **A-d-Agar** konnte der Stamm M_2 auch bei Zusatz von Pepton und Fleischextrakt nicht zur Gasbildung gebracht werden, dagegen wohl zu einem als normal imponierenden Wachstum. Der Stamm P_{12} zeigte bei einem Zusatz von 1 Proz. Pepton eine schwache Vergärung (einige Gasblasen), die bei einem Zusatz von 2 und 3 Proz. etwas zunahm. Auch Fleischextraktzusatz allein (von 0,5 bis 1 Proz. an) bewirkte schwache Vergärung. Trotzdem wurde durch die Kombination von Pepton und Fleischextrakt im A-d-Agar auch nur eine relativ schwache Vergärung (d. h. immer noch kleinblasige ohne Zerreißung) erzielt.

Bei Coli-Bazillen setzte schon bei 1/100 Proz. Peptonzusatz eine kleinblasige Vergärung ein, die sich bereits bei 1/10 Proz. zu stark

1) H. Braun u. C. E. Cahn-Bronner (18), S. 7, teilen mit, daß das Kochsalz sich in dem von ihnen verwendeten Milchsäure-Ammoniaknährboden ebenfalls als entbehrlich erwies.

blasenförmiger Vergärung mit beginnender Zerreißung steigerte; ganz ähnlich wirkte der Fleischextraktzusatz.

Wie anspruchslos Coli- und ebenso Paratyphus-B-Bazillen in ihren Ansprüchen an einen geeigneten Vergärungsnährboden sind, zeigt folgender Versuch: Auf ein Schrägagarröhrchen (Nähragar) werden 5 ccm destillierten Wassers gegeben und mit einer Oese vorsichtig die Bewegung, die man beim Abschwemmen eines Agarrasens macht, ausgeführt. $^1/_2$ ccm dieser Flüssigkeit, zu A-d-Agar in hoher Schicht gegeben, genügt, um nach Beimpfung mit Coli-Bazillen und Bebrütung Gärblasen entstehen zu lassen.

Im **Pl.**- und **Fl.-Agar** sind nur die „schwachen" Vergärer von Interesse. Denn diese Nährböden bieten schon ohne Zusätze den „starken Vergärern" ausreichende Mengen von Nährstoffen, um ihnen reichliche Gasbildung zu ermöglichen.

M_2 und P_{12} konnten im **Pl.-Agar** ohne Zusatz gar nicht, mit Fleischextrakt als einzigem Zusatz (0,5—1 Proz.) nur zu schwacher Gärung (kleinblasig) gebracht werden. Beim Zusatz von etwa $^1/_{10}$ Proz. Pepton zu Pl.-Agar fing die Gasbildung mit einigen kleinen Blasen an und steigerte sich bei einem Zusatz von 1—2 Proz. bis zur Großblasigkeit und schwachen Rißbildung bzw. Zerreißung. Am besten wirkte gleichzeitiger Zusatz von 1—2 Proz. Pepton (ein weiterer Peptonzusatz bedeutete keine Verbesserung) und etwa 0,5 Proz. Fleischextrakt. Hier war eine reichliche Blasenbildung und schwache Zerreißung die Regel. Es entspricht dieser Nährboden ungefähr dem in früher angegebenen Versuchen öfters erwähnten, im Institut üblichen „Gebrauchsnährboden"; nur ist hier die Wasserstoffionenkonzentration mitberücksichtigt.

Eine Ueberraschung boten die Versuche mit **Fl.-Agar.** Schon ohne jeden weiteren Zusatz zeigten beide schwach vergärenden Stämme (mit und ohne Traubenzuckerzusatz) Gasblasenbildung. $^1/_{10}$ Proz. Peptonzusatz steigerte bei M_2 die Gärung hier schon wesentlich. Bei 1 Proz. und 1,5 Proz. Pepton erreichte die Gasbildung beim Stamm M_2 ihr Maximum: reichliche Gasblasenbildung und mäßige Zerreißung. Sie wurde durch Fleischextraktzusatz nicht mehr beeinflußt. — Beim Stamm P_{12} setzte bei 1 Proz. Peptonzusatz und mehr eine wesentliche Steigerung der Gärung ein, die bei 2 Proz. ebenso stark war wie eine Coli-Gärung, d. h. zu starker Zerreißung führte. Fleischextrakt allein wirkte wieder kaum fördernd auf die Gärung, während er zusammen mit Pepton ganz ohne Bedeutung im Fl.-Agar schien.

Es wurde auch die Gärung des Stammes P_{12} in Milchzuckeragar in der gleichen Weise untersucht. Hier stellte sich ebenfalls Fl.-Agar mit einem Peptonzusatz von 1—2 Proz. als optimal heraus. Doch blieb die Gärung hinter der mit Traubenzucker zurück. Das Maximum war reichliche Bildung von Gasblasen und schwache Rißbildung bis Zerreißung.

Es ist noch von Interesse und verdient der Hervorhebung, daß die Gärung in den ungünstigen Nährböden durch Abweichungen von der „optimalen Gärungsreaktion" leichter und stärker gehemmt wird als in den günstigen.

Tabelle V.

Stämme	A.-d.-A.	A.-d.-A. + Trb.	A.-d.-A. + Trb. + Pepton				A.-d.-A. + Trb. + Fleischextrakt			A.-d.-A + Trb. + 1 Proz. Pepton + Fleisch extrakt	
			1/100 %	1/10 %	1 %	2 %	1/10 %	1/2 %	1 %	1/2 %	1 %
M 2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
P 12	—	—	—	–	<+	+	–	<+	<+	+	+
Coli-Bac.	—	—	+	>++	+++	+++	+	++	++	+++	+++
	Pl.-A.										
M. 2	—	—	—	<+	+	++	—	+	+	>++	>++
P 12	—	—	—	<+	+	++	—	+	+	>++	>++
	Fl.-A.										
M 2	<+	+	+	++	+++	+++	+	+	+	+++	+++
P 12	+	+	+	++	>+++	++++	+	>+	>+	>+++	>+++

Zeichenerklärung:

A.-d.-A. = Aqua dest.-Agar,
Pl.-A. = Plazentawasser-Agar,
Fl.-A. = Fleischwasser-Agar,
Trb. = Traubenzucker,
— = keine Gasbildung,
\+ = schwache kleinblasige Vergärung,
++ = stark blasenförmige Vergärung,
+++ = stark blasenförmige Vergärung und Zerreißung,
++++ = starke Zerreißung,
< = schwächer als,
> = **stärker als**

Zusammenfassend läßt sich über diese Versuche sagen: Fleischwasserzuckeragar mit genügendem Peptonzusatz und günstiger pH-Konzentration stellt einen für die untersuchten Stämme besonders günstigen Gärungsnährboden dar. Fleischextrakt zusammen mit Plazentawasser kann das Fleischwasser keinesfalls ersetzen. Ein Peptongehalt von mindestens 1 Proz. ist unentbehrlich! In einem solchen als optimal erkannten Nährboden (Fleischwasserzuckeragar mit mindestens 1 Proz. Peptonzusatz und günstiger pH-Konzentration) konnte der „schwache" Vergärer P_{12}, der in einigen Vorversuchen überhaupt keine Gasbildung zeigte, zu starker Vergärung, und M_2, der ein inkonstanter Vergärer zu sein schien, zu **regelmäßiger** mittelstarker Vergärung (reichliche Blasen und mäßige Zerreißung) innerhalb 24 Std. gebracht werden.

Auch die Bildung von Gas aus Milchzucker erreichte bei einem schwachen Milchzuckervergärer P_{12} durch dieselben optimalen Ernährungsbedingungen ihr Maximum.

Auch Glyzerin vergärende Coli-Bazillen wurden unter wechselnden Bedingungen untersucht. Es erwies sich ihre kräftige Gasbildung aus Glyzerin in der gleichen Weise vom Nährboden abhängig wie die der Coli-Bazillen bei der Traubenzuckervergärung [vgl. (35)].

Native Eiweißstoffe.

Es wurden weiter einige native Eiweißstoffe in ihrer Bedeutung für die Gärung untersucht. Da Serumzusätze zur Verbesserung der Nährböden in weitem Umfange (optimale Nährböden) (27, 28) ge-

braucht werden, war die Möglichkeit eines Einflusses solcher Zusätze auch auf die Gärung denkbar. Es wurden Versuche sowohl mit Rinderserum wie auch mit Ascites angestellt.

Es wurde gezeigt, daß diese Zusätze für eine Förderung der Gasbildung bei den „schwachen" Vergärern M_2 und P_{12} völlig bedeutungslos sind. Denn es konnte weder im Fleischwasseragar, in dem schon eine Stickstoffquelle (Fleischwasser) vorhanden ist, das Pepton durch Serum oder Ascites ersetzt werden; noch wurde der Fleischwasser-Pepton-Nähragar, der sich bis jetzt als optimal für die Vergärung durch M_2 und P_{12} erwiesen hatte, durch Zusatz dieser nativen Eiweißstoffe in seiner gärungsfördernden Wirkung auf die Stämme M_2 und P_{12} gesteigert.

Anders bei einem „starken" Vergärer, wie dem Bact. coli. Die Wirkung von Pepton und Serum allein sowie ihrer Kombinationen auf die Zuckervergärung von Bact. coli erläutert Tabelle VI. Wurde ausschließlich Serum oder Ascites als Stickstoffquelle gegeben (diese Substanzen wurden, wie früher beschrieben, dem A-d-Agar zugesetzt), so kam ohne andere Zusätze von Stickstoffverbindungen wie Pepton oder Fleischwasser bei einem Gehalt von 10 Proz. des nativen Eiweißes eine mittelstarke Traubenzuckervergärung (Zerreißung) zustande. Bei einem Gehalt des A-d-Agars von nur 1 Proz. an nativem Eiweiß war die Gasbildung aus Traubenzucker durch Bact. coli nur sehr schwach (einige Gasblasen). Peptonzusatz als einzige Stickstoffquelle ermöglichte eine wesentlich bessere Gasbildung. Wie wir schon sahen, reicht noch $^1/_{100}$ Proz. Pepton aus zur schwachen Gasbildung aus Traubenzucker; $^1/_{10}$ Proz. Pepton führt noch zur schwachen Zerreißung; erst bei $^1/_{1000}$ Proz. Peptongehalt hört jede Gasbildung auf[1]). — Vergleichen wir die Wirkung von Pepton und nativem Eiweiß als einzige Stickstoffquellen auf die Traubenzuckervergärung der Coli-Bazillen, so finden wir, daß 1 Proz. Pepton noch wesentlich besser wirkt wie 10 Proz. natives Eiweiß (Serum). Aber 10 Proz. Serum hat stärkere Wirkung als 0,1 Proz. Pepton.

Die Kombination von Pepton und Serum bewirkte eine Steigerung der Zuckervergärung im Vergleich zu jedem Faktor einzeln. Es scheint sich hier um eine Summationswirkung zu handeln.

Für die „schwachen" Vergärer dagegen ließ sich keinerlei Wirkung des nativen Eiweißes auf die Gärung konstatieren.

Tabelle VI.

Traubenzuckervergärung von Bact. coli in A.-d.-Agar mit 1 Proz. Traubenzuckergehalt bei Zusatz von Pepton und Serum nach 15 Std. Bebrütung.

		Serum 10 Proz.	Serum 1 Proz.
.	.	++ Z	+ (einige Bl.)
Pepton 1 Proz.	+++ Z	++++ Z	+++ Z
„ 0,1 „	+ Z	+++ Z	++ Z
„ 0,01 „	+ Bl.	+++ Z	+ Bl.
„ 0,001 „	—	++ Z	<+ (2 ganz kleine Bl.)

(Z = Zerreißung, Bl. = Blasen.)

1) $^1/_{100}$—$^1/_{1000}$ Proz. wäre daher auch die Grenze der Möglichkeit des Peptonnachweises, bis $^1/_{100}$ Proz. kann der Nachweis durch Traubenzuckervergärung von Bact. coli in A.-d.-Agar mit Sicherheit erbracht werden.

Aminosäuren.

Als Beispiel einiger Eiweißabbaustufen wurden Tryptophan, Tyrosin und Asparagin[1] als Zusätze zu Fl.-Agar untersucht. Da „starke Vergärer“ schon bei geringem Zusatz der genannten Aminosäuren aus Traubenzucker reichlich Gas bilden, ist hier allein das Verhalten der „schwachen Vergärer“ von Interesse. Es wurden wieder die Stämme M_2 und P_{12} zu den Untersuchungen benutzt, die ganz verschiedenes Verhalten aufwiesen.

In der Tabelle VII sind die Versuche mit den drei genannten Aminosäuren in kurzer Uebersicht zusammengestellt. (Tab. VII s. S. 204 u. 205.)

So wurde für den Stamm M_2 bei Tryptophan- und Tyrosinzusatz und gleichzeitigem Peptonzusatz (1 Proz.) keine Aenderung im Gärungsgrad beobachtet. Wurde Fl.-Agar ohne Pepton nur mit Tryptophan und Tyrosinzusatz benutzt, so wurde die Gärung geringer, bei Tyrosin nahm sie mit wachsendem Zusatz ab, d. h. also, daß Tryptophan und Tyrosin für den Stamm M_2 das Pepton keinesfalls ersetzen können, im Gegenteil wirkt Tyrosin ohne gleichzeitigen Peptonzusatz eher hemmend.

Anders verhält sich der Stamm P_{12}. Zwar bewirkt ein Zusatz von Tryptophan oder Tyrosin zu Peptonfleischwasser-Zuckeragar keine weitere Gärungssteigerung. Aber wenn statt Pepton nur Tryptophan[2]) oder nur Tyrosin[2]) dem Fl.-Agar zugesetzt wird, so erreicht die Gasbildung denselben Grad wie mit alleinigem Peptonzusatz. Für P_{12} können also diese beiden Aminosäuren das Pepton gleichwertig vertreten, zur Erzielung einer starken Gasbildung aus Traubenzucker.

Besonders interessante Ergebnisse hatten die Parallelversuche mit Asparagin. Es bedeutete für M_2 der Asparaginzusatz eine starke Gärungshemmung. Alleiniger Zusatz von Asparagin ergab nach 24 Std. überhaupt keine Gasbildung, erst später kam es zu einer nachträglichen, aber nur minimalen Entwicklung von Gas in Form eines oder zweier Bläschen. Bei gleichzeitigem Zusatz von Pepton wurden bei 0,3 ‰ Asparaginzusatz noch Gasblasen gebildet, bei höherem Zusatz nahm die Gasbildung schnell ab und blieb bei 3‰ Asparaginzusatz völlig aus. Wachstum war stets eingetreten. (Auch hier kam später nur eine ganz schwache Gärung nach.) Das Asparagin kann also das Pepton nicht ersetzen, es wirkt sogar bei Peptongehalt hemmend auf die Traubenzuckervergärung von M_2.

Wieder zeigt P_{12} ein ganz anderes Verhalten. Zwar wird die schon im Pepton-Fleischwasser-Zuckeragar sehr kräftige Vergärung durch den Asparaginzusatz nicht merklich gesteigert. (Bei M_2 trat eine Hemmung ein!) Aber der Asparaginzusatz allein wirkt in den schwachen Konzentrationen ebenso gut wie Pepton; bei den stärkeren Konzentrationen (0,9 und 3‰) ist eine deutliche Steigerung der Gasbildung im Vergleich zum Pepton-Fleischwasseragar (ohne und mit Asparaginzusatz) zu verzeichnen.

Wir haben also hier das merkwürdige Ergebnis, daß Asparaginzusatz den einen der schwachen Vergärer in der Gasbildung hemmt (M_2),

1) Die Zusätze hatten auf die Wasserstoffionenkonzentration keinen Einfluß.
2) Es standen uns Tryptophan und Tyrosin der Chem. Werke Grenzach A.-G. zur Verfügung.

Gasbildung nach 24 S

	ohne Zusatz	1 % Pepton	1 % Pepton + Tryptophan			Tryptophan			1 % Pepton + Tyrosin		
			0,3	0,9	3 ‰	0,3	0,9	3 ‰	0,3	0,9	3 ‰
M 2	<+	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+++	+++	++
P 12	+	>+++	>+++	>+++	>+++	>+++	>+++	>+++	>+++	>+++	>++

den anderen steigert (P_{12}). Es scheint dies besonders bemerkenswert, da man in der Literatur häufig die Angabe findet, daß allgemein eine erhöhte Konzentration stickstoffhaltiger Nährstoffe die Gärung (und zwar ist hier stets die Bildung flüssiger Säure gemeint) fördert (26), S. 297. Es wird dieses Verhalten in der Arbeit von R. Rühle (29) dadurch erklärt, daß das Mehr an gebildeter Säure durch das Eiweiß gebunden wird. Er konnte in seinen Versuchen mit Bact. coli zeigen, daß die aktuelle Azidität durch Eiweiß nicht gesteigert wird, und daß nur die Quantität der gebildeten Säure erhöht wird. Eine ähnliche Auffassung des gärungssteigernden Einflusses des Peptons durch Pufferwirkung vertritt Fr. Müller (30). Es mag sein, daß in manchen Fällen eine solche Säurebindung durch Eiweiß statthat; jedenfalls zeigen unsere Versuche, in denen es sich allerdings um Gasbildung, nicht um Bildung flüssiger Säure aus Zucker handelt, daß hier die Gärungsförderung abhängig ist von der **Art** der gewählten Stickstoffverbindungen, und daß die Ansprüche der verschiedenen Bakterienarten an die Stickstoffquelle individuell durchaus verschieden sind; die einen bevorzugen Eiweißabbauprodukte, wie Pepton, die anderen Aminosäuren, hier speziell Asparagin (P_{12}), während natives Eiweiß, das für die Gärung von Bact. coli noch eine mäßige Stickstoffquelle abgibt, für die „schwachen" Vergärer ohne Bedeutung ist. Einheitlich wird sich daher die Frage der Gärungssteigerung durch N-haltige Stoffe wohl keinesfalls beantworten lassen.

In diesem Zusammenhang muß auch darauf hingewiesen werden, daß verschiedene Herstellungsnummern von Fleischwassernähragar sich in ihrem Vergärungsvermögen verschieden verhalten können. So sind uns zwei Herstellungsnummern in der Erinnerung, von denen die eine die Gasbildung des Stammes M_2, weniger die von P_{12} begünstigte, während die andere die Gasbildung von P_{12} deutlich, weniger die von M_2 förderte. Man kann hier an Differenzen in der stofflichen Zusammensetzung des Nähragars, eventuell direkt an Gegenwart bzw. Abwesenheit solcher sich ähnlich wie Asparagin verhaltenden Aminosäuren denken.

Urin.

Es wurde endlich noch eine Versuchsreihe mit Urin angesetzt. Zuerst wurden Coli-Bazillen in A-d-Agar geprüft, und festgestellt, daß ein geringer Urinzusatz von etwa $^1/_{10}$ Proz. die Traubenzuckerspaltung bis zur Gasbildung ermöglicht; bei 1—10 Proz. Urinzusatz wird die Gärung erheblich gesteigert (Zerreißung der Agarsäule). Bei den geringen Ansprüchen von Bact. coli an die Stickstoffquelle war dies

belle VII.
in Fl.-A. + Trbz. 1 %.

Tyrosin			1 % Pepton + Asparagin			Asparagin		
0,3	0,9	3 ‰	0,3	0,9	3 ‰	0,3	0,9	3 ‰
< +	< +	—	<+++	< +	—	—	—	—
>+++	>+++	>+++	>+++	>+++	>+++	>+++	++++	++++

nicht anders zu erwarten. — Anders bei den Stämmen M_2 und P_{12}, die in Fl.-Agar geprüft wurden. Bei ihnen wurde festgestellt, daß Urinzusatz auf die Vergärung von Zucker durch M_2 hemmend wirkt. Mit Pepton zusammen ist im Fl.-Agar bei Urinzusatz die Gärung schwächer als mit Pepton allein. Mit Urin als einzigem Zusatz wurde gar keine Gärung erzielt. — Auch bei P_{12} ließ sich eine gewisse, aber weniger große Hemmung als bei M_2 durch den Urinzusatz konstatieren. — Daß auch hier die Wasserstoffionenkonzentration beachtet wurde, braucht wohl kaum besonders bemerkt zu werden.

IV. Wechselnder Zuckergehalt.

Es muß noch der Einfluß wechselnden Zuckergehaltes erwähnt werden. Aus den bereits mehrfach zitierten Untersuchungen von Th. Smith (6), Bd. 1, S. 568, wissen wir, daß eine Steigerung der Traubenzuckermenge über 1 Proz. hinaus die Bakterien schädigen kann. R. Rühle (29) studierte den Einfluß wechselnder Traubenzuckermengen zwischen 0 und 10 Proz. auf die Säurebildung von Bact. coli. Seinen Befund sowie seine Angaben aus der Literatur geben wir hier wieder: „Von einer Gärungsförderung durch Kohlehydrate können wir nur sprechen bei Konzentrationen von 0 Proz. bis etwas über $^1/_2$ Proz.; danach findet eine Gärungssteigerung kaum mehr statt. Zu diesem Resultat, wenn auch nicht so exakt ausgedrückt, kam auch Blühdorn, der fand, daß zwischen 1 Proz. und 4 Proz. Kohlehydrat keine Gärungsdifferenz besteht. Der Bakteriologie war diese Tatsache schon aus Untersuchungen Kaysers und Mendels bekannt, und neuerdings fand Wolff, der sogar Konzentrationen bis 20 Proz. untersuchte, ebenfalls keine Gärungssteigerung zwischen 1 Proz. und 20 Proz., ja, in den höheren Konzentrationen sogar eine mäßige Abnahme.“

Unsere Versuche über den Einfluß verschiedener Zuckermengen auf die Gasbildung bestätigen diese Angaben durchaus. Natürlich wird die Bedeutung dieser Zuckerkonzentrationen für die Gärung, wie Fr. Müller näher ausführt, von der übrigen Zusammensetzung des Nährbodens abhängen.

Es wurde deshalb in den meisten der hier beschriebenen Versuche kein über 1 Proz. hinausgehender Kohlehydratzusatz angewendet. Noch bei $^1/_{10}$ Proz. Zuckerzusatz ist die Gasbildung lebhaft. Es tritt reichlich Blasenbildung und sogar noch schwache Zerreißung der Agarsäule ein. Selbst bei $^1/_{100}$ Proz. ist die Agarschicht noch blasenförmig vergoren. Es läßt sich also $^1/_{100}$ Proz., d. h. 1 mg Zucker in der gewöhnlichen hohen Schicht, noch bequem nachweisen, während $^1/_{1000}$ Proz. Zucker durch Bakterien nicht mehr nachgewiesen werden

kann. Ein Zuckernachweis ist also noch mindestens bis 1:10000 möglich. Die Methode des quantitativen Zuckernachweises ist durch Verdünnung bis zur Nichtvergärung leicht ausführbar.

V. Gärungsreize und Gärungshemmungen.

In einem letzten Abschnitt soll die Frage der „positiven" und „negativen Gärungsreize" erörtert werden. Wir denken hier an Stoffe, die, ohne direkt — wie die bisher behandelten Stoffe — der Ernährung zu dienen, die Gärung in positivem oder negativem Sinne beeinflussen.

R. Bieling (31) hat in seiner Arbeit: „Untersuchungen über die intramolekulare Atmung von Mikroorganismen" der Frage der „Atemreize" durch eine Reihe von Versuchen näher zu kommen gesucht. Ebenso wie die Atmung fördernde oder hemmende Substanzen vorhanden sind, gibt es wohl Stoffe, die entsprechend die Gärung befördern oder hemmen.

Für die alkoholische Gärung sind eine große Reihe solcher Substanzen, die eine „stimulierende" Wirkung auf die Gärung ausüben, bekannt. Eine Uebersicht über diese „Gärungsaktivatoren" geben C. Neuberg und J. Hirsch (32). Es gehören darnach hierher Stimulatoren aus der Zuckerreihe, ferner zahlreiche Verbindungen aus der Gruppe der aldehydischen und ketonischen Pflanzenbasen, der Chinone und reduzierbaren Farbstoffe, mannigfache Nitro- und Nitrosokörper, sowie Hydroxylaminderivate und schließlich Disulfide. Wie die beiden Autoren sagen: „Die biologisch bedeutsame Rolle, die Gärung zu stimulieren, kommt ersichtlich den heterogensten Stoffen zu."

„Die fördernde Wirkung von Kohlensuspensionen und anderen Körpern mit großer Oberflächenentwicklung, wie Kolloidkieselsäure, Ferrum phosphoricum, Agar-Agar" auf die bakterielle Gärung, speziell auf die Gasbildung von Bact. Coli hat R. Labes (33) studiert. Es wurde ein „hervorragend günstiger Einfluß auf die Gärgasbildung von Bact. coli in eiweißfreien Nährlösungen" festgestellt.

Wir konnten gärungsfördernde und -hemmende Substanzen feststellen.

Es soll zuerst von den Fördersubstanzen die Rede sein. Solche die Gärung befördernden Stoffe sind vielleicht Bestandteile des Fleischwassers, die neben Nährstoffen in ihm enthalten sind. In welchem Maße das Fleischwasser gerade bei schwachen Vergärern die Gasbildung erhöht, ist aus den früheren Angaben zu ersehen; das entspricht der Feststellung R. Bielings, daß unter den die Atmung fördernden Stoffen gleichfalls Fleischbrühe zu nennen ist.

In noch stärkerem Maße atmungsfördernd erwiesen sich nach seinen Angaben alte Bouillonkulturen. Um den Einfluß solcher alten Bouillonkulturen auf Gärungsbeförderung zu prüfen, wurden 4 Tage alte Kulturen von Staphylococcus aureus, Bact. coli, P_{12} und M_2 durch Hitze (65° C) abgetötet und im Verhältnis 1:4 zu Peptonfleischwasseragar zugesetzt. Als vergärende Bakterien wurden Coli-Bazillen, die Stämme P_{12} und M_2 (Traubenzuckerzusatz), sowie 2 Milchzucker schwach angreifende Paracolistämme[1]) (Milchzuckerzusatz) ver-

1) Die Bezeichnung Paracolibazillen soll darauf hinweisen, daß diese Stämme auf der Endo-Platte hell wachsen.

wendet. Es zeigte sich, daß der Staphylokokkenkultur und noch mehr der Kultur des Stammes P_{12} eine gewisse fördernde Wirkung auf die Gasbildung zukommt. Eine, wenn auch geringe Verstärkung, wurde auch durch die alte Coli-Kultur erzielt. Bemerkenswert ist, daß die Kultur P_{12} auch auf den eigenen Stamm in positivem Sinne wirkte. Eine hemmende Wirkung zeigte die alte M_2-Kultur sowohl gegen die 2 Paracoli-Stämme, als auch besonders gegen den eigenen Stamm, während sie den Stamm P_{12} nicht beeinflußte.

In der Hoffnung, Gärungsförderung zu erreichen, wurden auch einige giftige Salze in verschiedenen Konzentrationen dem Nähragar zugesetzt, und die Gasbildung durch Traubenzuckervergärer untersucht. Von Salzen wurden verwendet: Quecksilberchlorid, Kupfersulfat, Silberzyankalium und Fluornatrium. Die Testbakterien waren Coli-Bazillen, die Stämme P_{12} und M_2. Bei der Verdünnung 1:1 Million wurde für Quecksilberchlorid, Kupfersulfat und Silberzyankalium eine wenig bemerkenswerte Steigerung der Gasbildung beobachtet. Bei den stärkeren Konzentrationen: 1:100000, 1:10000, 1:1000 trat eine Abschwächung bzw. Hemmung der Gärung durch die Giftwirkung ein. Fluornatrium zeigte keine Gärungsförderung.

Zu den „negativen Gärungsreizen“ kann man die schon erwähnte Hemmung zählen, welche die alte Bouillonkultur M_2 auf die beiden Paracoli-Stämme und auf den Stamm M_2 selbst ausübt. Auch an die hemmende Wirkung des Asparagins auf den Bac. inconstans M_2 muß in diesem Zusammenhang nochmals erinnert werden.

Von besonderem Interesse ist die Wirkung eines salpetersauren Salzes, des Kaliumnitrats. Es hindert nämlich Kaliumnitrat die Gasbildung auch bei „starken Vergärern“ in relativ schwachen Konzentrationen. Dabei scheint es sich nicht um Wachstumshemmung zu handeln. Denn die verwendeten Zusätze von Kaliumnitrat behindern das Wachstum in der hohen Schicht wohl nicht merklich, wie eine regelmäßig auftretende starke Trübung des Agars durch das Durchwachsen der Bakterien in den Kaliumnitratröhrchen zeigte. Welches sind die hemmenden Konzentrationen? Ein Zusatz von 0,02 Proz. Kaliumnitrat hindert in gewöhnlichem Agar, der ja immer etwas Traubenzucker enthält, die Bildung der durch Coli- und Paratyphus-Bazillen sonst entstehenden kleinen Gärbläschen. Der zehnte Teil dieser Menge, also 0,002 Proz., hindert die Bläschenbildung nicht mehr. Derselbe Zusatz von 0,02 Proz. Kaliumnitrat vermag auch in 1 Proz. Traubenzuckeragar bei Paratyphus-B-Bazillen noch eine schwache Gärungshemmung hervorzurufen, bei Coli-Bazillen war sie hier nicht mehr zu beobachten, dagegen hemmt die 5fache Menge, also 0,1 Proz. Kaliumnitrat die Gasbildung der Paratyphus-B-Bazillen in 1proz. Traubenzuckeragar völlig, ebenso wird hier die Gasbildung der Coli-Bazillen durch den gleichen Zusatz stark gehemmt (nur Blasenbildung, keine Zerreißung).

Tab. VIII zeigt die Versuchsergebnisse mit Kaliumnitrat in kurzer Uebersicht.

Tabelle VIII.

Kaliumnitrat		0,1 Proz.	0,02 Proz.	0,002 Proz.
Gasbildung von Coli- u. Paratyphus-B in gewöhnlichem Agar		—	—	+
in 1proz. Traubenzuckeragar	Coli	—+	+	+
	Paratyphus-B	—	—+	+

Die geschilderten Versuche stimmen mit Befunden von Groetschel (34) überein, der in Wasser, welches größere Mengen von Nitraten (etwa 100 mg im Liter) enthielt, einen negativen Eijkmann bei positivem Coli-Befund feststellte. Groetschel gibt für diesen merkwürdigen Befund folgende Erklärung: „Der bei der Gärung sich bildende Wasserstoff reduziert in statu nascendi die Nitrate zu Nitriten. Er tritt deshalb als Gas nicht zutage. Die bei dem Gärungsprozeß entstehende Kohlensäure kann sich im Wasser lösen.“ Dieser Erklärung können wir uns nach unseren Versuchen nicht anschließen. Denn wenn auch der Wasserstoff gebunden würde, so müßte doch in der hohen Schicht die Kohlensäure sich in Gasform zeigen. In welche Weise die Wirkung des Kaliumnitrats sonst erklärt werden könnte, können wir z. Zt. nicht sagen; wir wollen uns daher hier damit begnügen, sie als starken negativen Gärungsreiz zu bezeichnen.

Aber man könnte daran denken, die Stärke des Gärvermögens eines Stammes auf dem Umwege über die Hemmung durch das Kaliumnitrat quantitativ zu bestimmen.

Anhangsweise seien hier zwei Anwendungsgebiete der Gärung in hohen Schichten angegeben:

I. Die Prüfung der Wirkung gärungshemmender Stoffe.

Bakterizide Stoffe werden bekanntlich in Abtötungs- und Hemmungsversuchen im Vergleich mit bekannten bakteriziden Stoffen geprüft. Anstatt die wachstumshemmende Konzentration in flüssigen Nährböden zu bestimmen, kann man auch die gärungshemmende Konzentration bei bestimmten Bakterienarten in hohen Schichten feststellen. Ein Vorzug dieser Methode vor der üblichen Bestimmung der Wachstumshemmung liegt darin, daß eine Verschmutzung durch Luftbakterien beim Arbeiten mit festen Nährböden so gut wie ausgeschlossen ist. Weiterhin ist die Beobachtung sehr einfach: mikroskopische Untersuchung erübrigt sich. Auch kann diese Art Hemmungsversuche selbst mit Substanzen, die mit den Nährböden Niederschläge erzeugen, ohne Beeinträchtigung der Beobachtung ausgeführt werden.

Als Testmaterial sind natürlich nur Gärungsorganismen verwendbar: Paratyphus-, Coli-, Proteus-Bazillen, Hefen usw.

Da uns gerade ein Präparat vorlag, dessen Eignung zur Konservierung von Fruchtsäften und Marmeladen geprüft werden sollte, führten wir vergleichende Gärungshemmungs-Untersuchungen mit ihm aus. Dieses Untersuchungsverfahren war hier besonders am Platz, da ja Früchte hauptsächlich durch Gärungserreger, besonders durch Hefen verdorben werden. Im Folgenden seien die Versuche kurz mitgeteilt:

Es wurde das Präparat X verglichen mit Natriumbenzoat, einem bekannten Konservierungsmittel. Ferner wurde die Verstärkung der Hemmungswirkung beider Mittel durch Zitronensäure untersucht.

Methodik der Versuche.

Bact. coli und Saccharomyces cerevisiae dienten als Testorganismen. Die Coli-Bazillen wurden auf Schrägagarnährböden (20 Std. bei 37° C), die Hefe auf Bierwürzeschrägagar (2 Tage 25 bis 30° C) gezüchtet. Eine Schrägagarkultur wurde mit 1 ccm physiolo-

gischer Kochsalzlösung abgeschwemmt und eine mittlere Oese dieser Aufschwemmung in die bei 45 ° C flüssig gehaltenen Versuchsröhrchen verimpft.

Als Nährmedium diente für Bact. coli Fleischwasseragarnährboden mit 1 Proz. Pepton und 1 Proz. Traubenzuckerzusatz ($p_H = 7,4$); für Saccharomyces wurde Bierwürzeagar (schwach saure Reaktion) benutzt, der einige Prozent vergärbare Maltose enthält. Die hohen Schichten wurden nach den früheren Vorschriften beimpft und im Brutschrank bei 37 ° C (Bact. coli) bzw. auf dem Brutschrank (Hefe, Temperatur 25—30 ° C) 8 Tage lang gehalten.

Tab. IX gibt die Versuche im Auszug wieder.

Tabelle IX.

Bact. coli.

		Präparat X				0	Natriumbenzoat			
		0,5 %	0,3 %	0,2 %	0,1 %		0,5 %	0,3 %	0,2 %	0,1 %
Citronensäure	1/2 %	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1/5 „	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1/10 „	—	—	—	—	++	—	—	—	—
	1/50 „	—	—	—	+	+++	—	—	—	++
	1/100 „	—	—	+	+++	++++	—	+	++	+++
	0	—	—	++	+++	++++	—	+	+++	++++

Saccharomyces cerevisiae.

	Präparat X						0	Natriumbenzoat					
	1 %	0,4 %	0,2 %	0,1 %	0,05 %	0,01 %		1 %	0,4 %	0,2 %	0,1 %	0,05 %	0,01 %
%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
„	—	—	—	—	—	—	++	—	—	—	—	—	—
„	—	—	—	—	—	—	+++	—	—	—	—	—	+
„	—	—	—	—	+	.	++++	—	—	—	—	.	.
„	—	—	—	—	.	.	+++++	—	—	—	+++	.	.
„	—	—	—	—	—	.	+++++	—	—	++++	++++	.	.
	—	—	++	++++	+++++	+++++	+++++	—	+++	++++	++++	+++++	+++++

Es bedeutet:

— keinerlei Gasbildung,
\+ blasenförmig vergoren,
++ stark blasenförmig vergoren und beginnende Rißbildung,
+++ zerrissen,
++++ stark zerrissen.

Die Versuche zeigen, daß die hemmende Wirkung des Präparates X auf die Gärung etwas stärker ist als die von Natriumbenzoat. Durch Zitronensäure werden beide Substanzen in ihrer Wirkung erheblich verstärkt. Vergleichende Untersuchungen der Wachstumshemmung und der abtötenden Wirkung dieser Stoffe hatten die gleichen Ergebnisse. Wir begnügen uns mit dieser Darstellung, da es uns in diesem Zusammenhang hauptsächlich darauf ankam, ein Beispiel für die Prüfung von Substanzen in Gärungshemmungsversuchen zu geben.

II. Prüfung von Substanzen zur Herstellung von Bakteriennährböden.

Die Nährfähigkeit von Substanzen — seien es Trockennährböden, Peptonpräparate des Handels, Fleischextrakt oder dergl. —, ist oft mühsam zu bestimmen. Gärversuche können uns unterstützen. Auch hier kommen nur Vergleichsversuche mit bekannten Nährsubstanzen in Frage. Man braucht nur festzustellen, in welchen Verdünnungen die betreffenden zu untersuchenden Substanzen — einem traubenzuckerhaltigen A-d-Agar zugesetzt — noch einen geeigneten Gärungsnährboden für Coli-Bazillen oder andere Vergärer abgeben, um sich ein Bild von der Brauchbarkeit dieser Stickstoffquellen für die Bakterien machen zu können.

Zusammenfassung.

1) Als Impfmethode zur Prüfung der Gärung in der hohen Agarschicht kommt nur die Schüttelkultur in Betracht. Diese muß so angelegt werden, daß gleich nach der Beimpfung 1—2mal kräftig geschüttelt wird, so daß die Luft durch die noch flüssige hohe Schicht hindurchperlt, weil hierdurch eine für die Zuckervergärung günstige Sauerstoffspannung erzielt wird. — 2) Der Sauerstoff ist in gewisser Konzentration ein die Gasbildung wesentlich begünstigender Faktor — übrigens auch für anaërobe Vergärer. — 3) Das frühere oder spätere Einsetzen der Gasbildung und die Quantität des gebildeten Gases ist in der hohen Schicht im Gegensatz zum Verhalten in flüssigen Medien weitgehend abhängig von der Menge der verimpften Bakterien. — 4) Passagen können auf die Gärung von Einfluß sein. Es konnte bei einem schwachen Vergärer durch Passagen die Gärungsintensität bis zu einem konstant bleibenden Maximum gesteigert werden. — 5) Bei der Herstellung von Zuckeragar müssen gewisse Vorsichtsmaßregeln beachtet werden: Durch längeres Erhitzen werden sowohl Traubenzucker als auch Milchzucker verändert; (Milchzucker spaltet Traubenzucker ab); ein in üblicher Weise hergestellter Agarnährboden enthält stets gewisse Traubenzuckermengen ($^1/_{50}$ Proz. und mehr); diese können aus der Bouillon oder dem Fleischwasser durch Beimpfen mit Bact. coli oder Bierhefe entfernt werden. Ein aus solcher „entzuckerter Bouillon“ hergestellter Agarnährboden bleibt längere Zeit auch bei Zimmertemperatur traubenzuckerfrei; setzt man dem Nähragar Milchzucker zu, so spaltet sich schon nach kurzem Stehen von Neuem Traubenzucker in geringen Mengen ab. Sterile konzentrierte 25proz. Milchzuckerlösung bleibt bei Zimmertemperatur unverändert; als einwandfreies Verfahren zur Prüfung von Gasbildung aus Milchzucker empfiehlt es sich, die sterile Milchzuckerlösung dem verflüssigten, aus „entzuckerter Bouillon“ hergestellten Agarnährboden unmittelbar vor der Beimpfung zuzusetzen. In ähnlicher Weise lassen sich auch andere

Kohlehydrate (z. B. Glyzerin) zur Feststellung der Gasbildung verwenden. Im sicher traubenzuckerfreien Agar sind Bläschenbildungen bereits diagnostisch verwertbar; in gewöhnlichem Laboratoriumsagar kann erst eine deutliche Agarzerreißung diagnostisch verwertet werden, während auch noch so zahlreiche Bläschen nur von einem gewissen Gehalt an Traubenzucker (etwa $^1/_{50}$ Proz.) zeugen. — 6) Die Wasserstoffionenkonzentration hat auf die Gärung wesentlichen Einfluß. Bestimmte Bakterienarten verlangen für optimale Gasbildung bestimmte, für die einzelne Art verschiedene Reaktion. Allein durch Einhalten dieser optimalen Reaktion konnten zwei bis dahin unregelmäßig vergärende Stämme zur regelmäßigen Gasbildung gebracht werden. — 7) Als optimaler Vergärungsnährboden muß für die untersuchten Stämme Fleischwasseragar mit 1 bis 2 Proz. Peptonzusatz und günstiger Wasserstoffionenkonzentration bezeichnet werden. — 8) Die Untersuchung verschiedener Stickstoffquellen (Pepton, Aminosäuren, Urin) ergab, daß die verschiedenen Bakterienarten in ihren Ansprüchen an die Stickstoffquellen sich durchaus verschieden verhalten. — 9) Es gibt Stoffe, die — vermutlich ohne der Ernährung zu dienen — auf die Gärung fördernd bzw. hemmend einwirken. — 10) Die Gärung in der hohen Schicht wird als Testmittel zur Prüfung der Wirkung bakterizider Stoffe und zur Prüfung von Bakteriennährböden empfohlen. Für die bakteriologische Untersuchung ist sie — richtig ausgeführt — die empfindlichste und brauchbarste Methode zur Feststellung von Vergärung von Kohlehydraten zu gasförmigen Endprodukten. — 11) Jedes Schwanken eines Stammes hinsichtlich seiner Vergärungsfähigkeit bedarf der gründlichsten Kontrolle (nach den entwickelten Gesichtspunkten), an zwei Beispielen konnte gezeigt werden, daß „schwankende" Stämme bei optimalen Bedingungen regelmäßig reagierten. — 12) Nach der angegebenen Methode läßt sich Traubenzucker noch bis mindestens 1:10000 nachweisen. Auch andere Kohlehydrate wird man so in kleinsten Mengen nachweisen können.

Zum Schluß sei zusammenfassend vor allem noch einmal darauf hingewiesen, daß es gelungen ist, eine Reihe von Faktoren aufzuzeigen, die einen wesentlichen Einfluß auf die Bildung von Gas aus Zucker ausüben.

Wir betonen noch einmal die Wichtigkeit der Impfmethode, den Einfluß der Menge der verimpften Bakterien und der Beschaffenheit des Impfmaterials (Passagen) auf die Gärung und erinnern an die Bedeutung des Sauerstoffs, der Wasserstoffionenkonzentration und geeigneter Stickstoffquellen sowie an die eigentümlichen Hemmungswirkungen mancher Stoffe, wie z. B. des Asparagins und Kaliumnitrats.

Es konnte durch Berücksichtigung dieser Faktoren gezeigt werden, daß Stämme, die vorher keine oder unregelmäßige Gasbildung gezeigt hatten, regelmäßige Vergärer sind.

Das ist von großer diagnostischer Bedeutung, denn es ist als sicher anzunehmen, daß noch manche der bisher beobachteten Unregelmäßigkeiten in der Gärung von Stämmen verschwinden, sobald diese Stämme mit exakter Versuchstechnik unter „optimalen" Bedingungen geprüft würden.

Wenn man die zahlreichen, häufig kaum bemerkbaren Fehlerquellen dieser scheinbar so einfachen Untersuchungstechnik bedenkt, wird man jenen zahlreichen Angaben über Wandlungen im Gärvermögen einzelner Stämme solange skeptisch gegenüberstehen müssen, bis wiederholte Untersuchungen mit als einwandfrei nachgewiesener und nachgeprüfter Technik das gleiche Ergebnis gezeitigt haben; man wird also bis dahin die bisherigen Angaben über Wandlungen nicht als Beweis für feststehende Dauerveränderungen ansprechen dürfen.

Bei Anwendung einer einwandfreien Technik[1]) aber ist es berechtigt, um zur eingangs gestellten Frage zurückzukehren, das Gasbildungsvermögen für die Unterscheidung der Bakterienarten in weitem Umfange heranzuziehen.

Erklärung der Tafelabbildungen.

Fig. 1. a) = Stichkultur, b) = Tropfkultur, c) = Schüttelkultur } Bact. coli, 10stünd. Bebrütung.

Fig. 2. a) 1 Min., b) 4 Min., c) 10 Min. Durchlüftung. Bact. coli, 10stünd. Bebrütung.

Fig. 3 zeigt 5 mit verschiedenen Mengen des Schaf-Abortus-Stammes L_{50} beimpfte Traubenzuckernähragarröhrchen nach 24stünd. Bebrütung.

Fig. 4 3 mit den Keimmengen 2, etwa 20, etwa 200 beimpfte Traubenzuckernährgelatineröhrchen. Bact. coli, mehrtägiges Wachstum.

Literatur.

1) P. Liborius, Ztschr. f. Hyg. Bd. 1. 1886. S. 115. — 2) M. E. van Ermengem, Rev. d'Hyg. 1896. p. 761. — 3) R. Burri, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 28. S. 321. — 4) L. Heim, Lehrbuch der Bakteriologie. 1922. — 5) M. Klimmer, Technik und Methodik der Bakteriologie u. Serologie. 1923. — 6) R. Kraus u. P. Uhlenhuth, Handbuch der mikrobiolog. Technik. — 7) K. B. Lehmann u. R. O. Neumann, Bakteriologische Diagnostik. 5. Aufl. 1912. — 8) Bergey, Manual of Determinative Bacteriology. Baltimore (Williams & Wilkins Comp.) 1923. — 9) Ornstein, Ztschr. f. Hyg. Bd. 91. 1921. S. 152. — 10) H. Braun, Ztschr. f. klin. Med. Bd. 91. — 11) Ders. u. P. Löwenstein, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 91. 1923. S. 1. — 12) P. v. Engering, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 92. 1924. S. 1. — 13) Seligmann, Centralblatt f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 93. 1924. S. 288. — 14) H. Pringsheim, Die Variabilität niederer Organismen. Berlin (Springer) 1910. S. 170. — 15) G. Enderlein, Bakterien-Cyklogenie. S. 178. — 16) H. Braun u. C. E. Cahn-Bron-

1) Es wäre an der Zeit, auch in Deutschland einige gut durchgeprüfte Methoden zu „normalisieren", wie es Amerika bekanntlich längst getan hat. Die oben mitgeteilte Prüfung sei dafür empfohlen. Neißer.

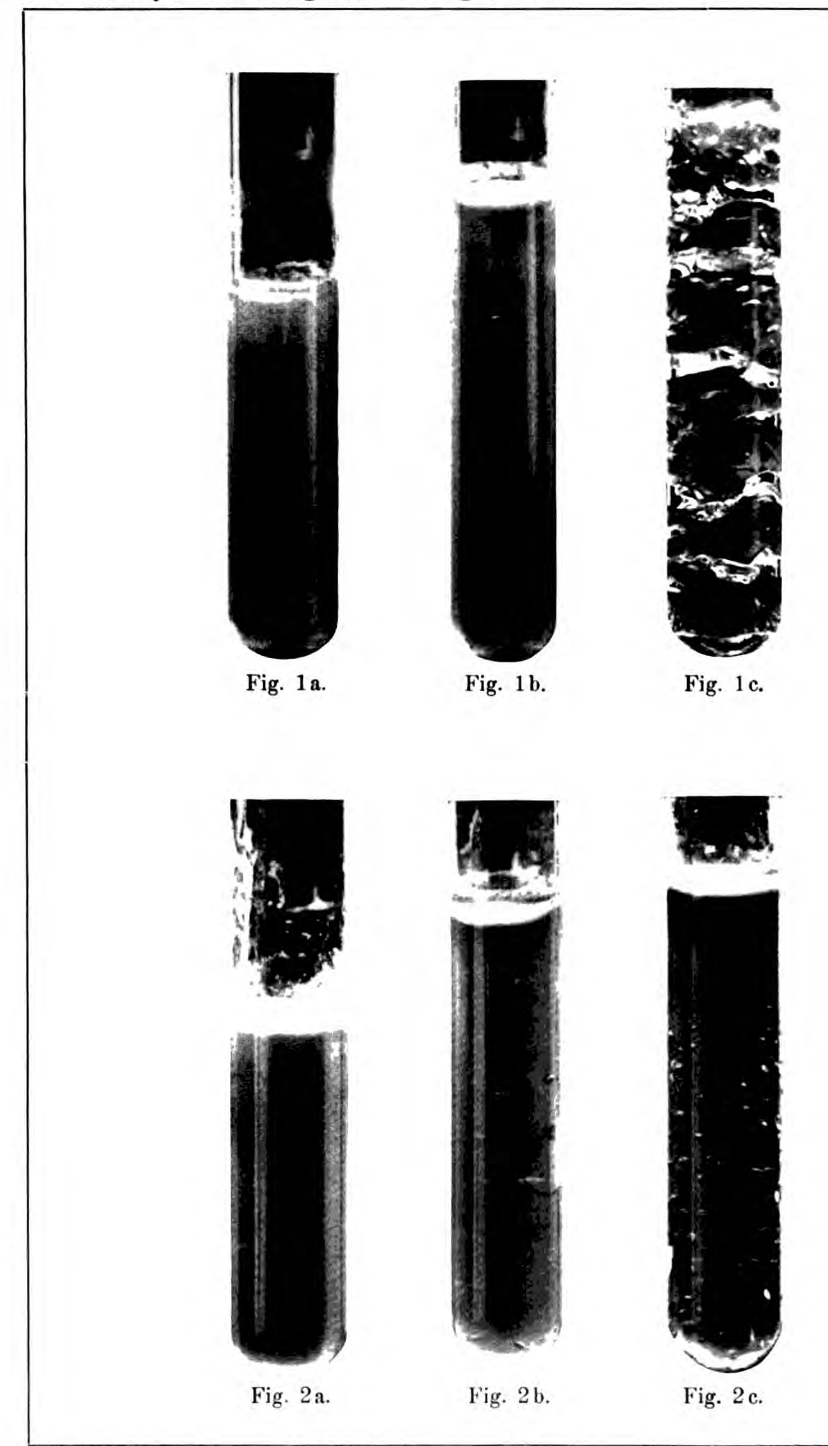


Fig. 1a. Fig. 1b. Fig. 1c.

Fig. 2a. Fig. 2b. Fig. 2c.

Verlag von

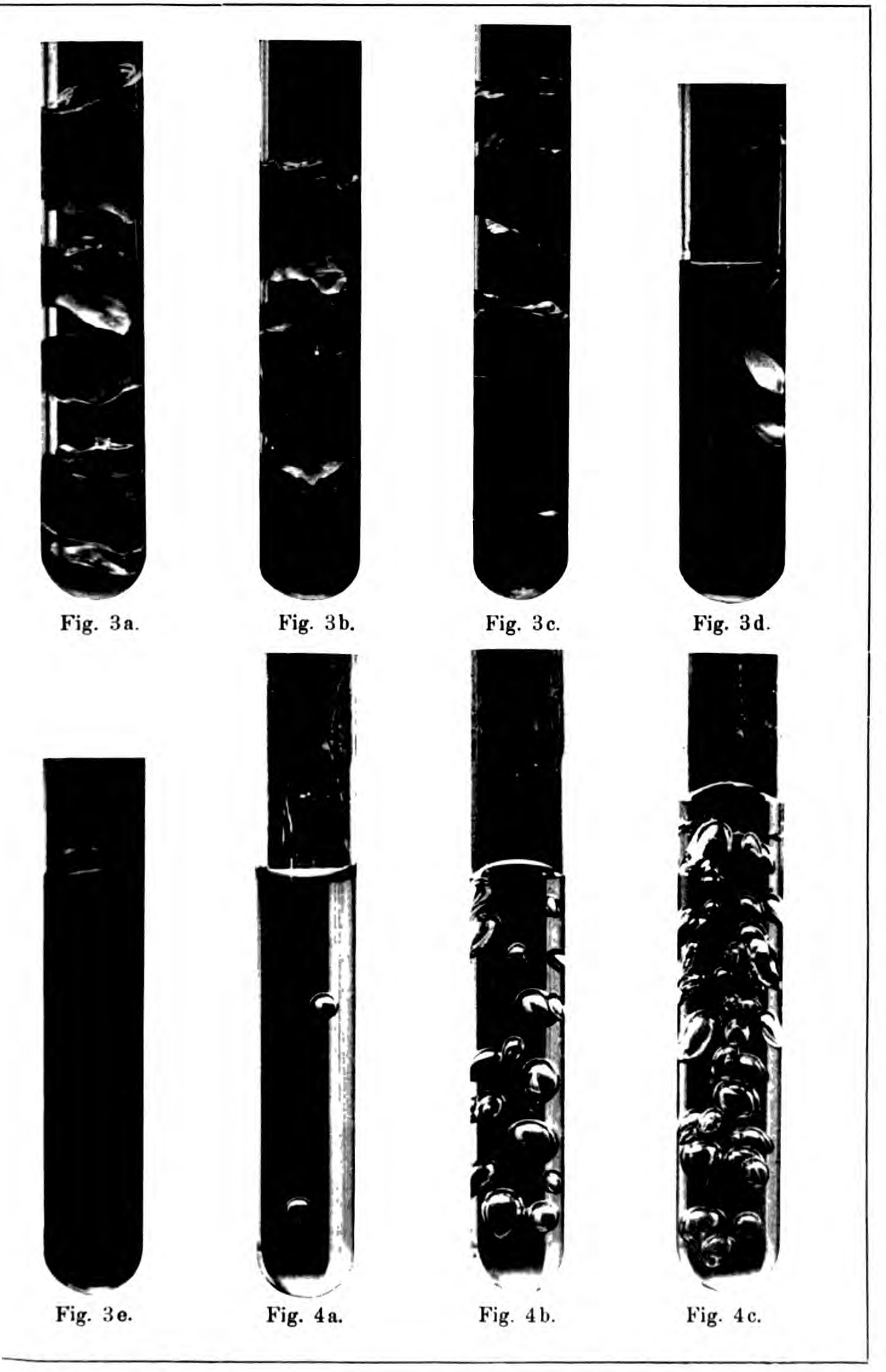


Fig. 3a. Fig. 3b. Fig. 3c. Fig. 3d.

Fig. 3e. Fig. 4a. Fig. 4b. Fig. 4c.

in Jena.

ner, Der Verwendungsstoffwechsel. II. Mitteilung. (Biochem. Ztschr. Bd. 131. 1922. S. 272.) — 17) Dies., Klin. Woch. 1 Jahrg. S. 1824. — 18) Dies., Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 86. S. 1, 196, 380. — 19) H. Lundin, Biochem. Ztschr. Bd. 141. 1923. S. 310 u. 342. — 20) O. Bail, Arch. f. Hyg. Bd. 95. 1925. S. 1. — 21) Th. Smith, Centralbl. f. Bakt. Bd. 18. 1895. S. 1. — 22) W. Frieber, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 86. 1921. S. 424. — 23) A. v. Jeney, Ztschr. f. Hyg. Bd. 100. 1923. S. 49. — 24) S. Spronck, Annal. de l'Inst. Pasteur. T. 9. 1895. p. 758. — 25) K. Scheer, Biochem. Ztschr. Bd. 130. S. 535 u. 545. — 26) W. Kruse, Allgemeine Mikrobiologie. Leipzig 1910. — 27) K. Süpfle, Arch. f. Hyg. Bd. 87. 1918. S. 232. — 28) Ders. u. Dengler, Arch. f. Hyg. Bd. 85. 1916. — 29) R. Rühle, Jahrb. f. Kinderheilk. Bd. 101. S. 138. — 30) Fr. Müller, Biochem. Ztschr. Bd. 131. 1922. S. 485. — 31) R. Bieling, Ztschr. f. Hyg. Bd. 100. 1923. S. 270. — 32) C. Neuberg u. J. Hirsch, Ergebn. d. Physiol. Bd. 21. I. 1923. S. 400. — 33) R. Labes, Biochem. Ztschr. Bd. 130. 1922. S. 1. — 34) Groetschel, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 92. S. 470. — 35) H. Neisser, Inaug.-Diss. Breslau 1925.

Zur Biologie der in künstlichen Nährböden gezüchteten Shiga-Kruse-Bazillen.

[Aus der bakteriologisch-hygienischen Abteilung des Städt. Hygienischen Universitätsinstituts in Frankfurt a. M.]

Von Dr. **K. Nakamura** (Tokio).

Durch die Untersuchungen von van Loghem (1), Kisch (2), H. Braun und C. E. Cahn-Bronner (3) ist festgestellt worden, daß sich in bezug auf die Ammoniak-Assimilation Typhusstämme verschieden verhalten können, indem einzelne Ammoniak als einzige Stickstoffquelle verwerten, andere dazu nicht imstande sind. Vom biologischen Standpunkte betrachtet, muß es bemerkenswert erscheinen, daß innerhalb ein und derselben Art die Befähigung zu einer so bedeutsamen Funktion, wie es die Ammoniak-Assimilation ist, vorhanden sein oder fehlen kann. van Loghem hat angenommen, daß die Ammoniak-Assimilation der Typhusstämme nur bei alten Laboratoriumskulturen vorkommt. Braun und C. E. Cahn-Bronner konnten feststellen, daß auch frisch aus dem menschlichen Organismus gezüchtete Typhusbazillen befähigt sein können, Ammoniak zu assimilieren. Diese Autoren haben weiterhin aus der Mehrzahl der nicht ammoniakassimilierenden Typhusstämme solche gewonnen, die Ammoniak assimilierten.

Auf Grund dieser Feststellungen schlossen H. Braun und C. Cahn-Bronner, daß die Typhusbazillen verschiedener Befähigung zur Ammoniak-Assimilation voneinander abstammen, und nahmen an, daß die mit größeren synthetischen Fähigkeiten ausgestatteten Individuen, welche einfacheren äußeren Verhältnissen angepaßt sind, den ursprünglichen Typ darstellen, aus denen unter uns unbekannten Umständen die defekten, nicht ammoniakassimilierenden Bakterien entstehen.

van Loghem ist in bezug auf die Abstammung der verschieden befähigten Keime anderer Auffassung als Braun und Cahn-Bron-

ner. Er betrachtet die nicht ammoniakassimilierenden Bakterien als den ursprünglichen Typ und faßt die Ammoniak-Assimilation als eine unter ungünstigen Ernährungsverhältnissen neu erworbene Eigenschaft auf.

F. H. Ter Poorten (4) und Tan Ping Je (5) haben aus dem Laboratorium van Loghems Versuche veröffentlicht, die diese Annahmen stützen sollen. Durch Züchtungen im Reagenzglase im Serum und in Kollodiumsäckchen, die in die Bauchhöhle von Kaninchen und Meerschweinchen versenkt waren, gelang es diesen Autoren, aus ammoniakassimilierenden Typhusbazillen solche zu züchten, die die Fähigkeit der Ammoniak-Assimilation teilweise oder vollständig eingebüßt haben. Andererseits konnten diese Autoren in Uebereinstimmung mit H. Braun und C. Cahn-Bronner aus nichtammoniakassimilierenden Typhusbazillen ammoniakassimilisierende gewinnen.

Nach diesen Angaben müßte man annehmen, daß die Ammoniak-Assimilation der Typhusbazillen nur unter ganz besonderen Umständen auftritt und daß sie beim Infektionsprozeß verloren geht. Das widerspricht den oben erwähnten Feststellungen von H. Braun und C. E. Cahn-Bronner, die in einer größeren Anzahl der Fälle aus kranken Menschen direkt ammoniakassimilierende Typhusbazillen züchten konnten.

Auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. H. Braun habe ich gelegentlich von Versuchen über die Giftbildung des Shiga-Kruse-Bazillus in aus chemisch bekannten Substanzen zusammengesetzten Nährböden die Frage des Verlustes der Ammoniak-Assimilation durch Züchtung in tierischen Gewebsflüssigkeiten untersucht, und möchte im folgenden in Kürze darüber berichten. Die verschiedenartige Befähigung zur Ammoniak-Assimilation wurde bekanntlich auch bei Shiga-Kruse-Bazillen aufgefunden.

Ein Shiga-Kruse-Stamm, der im Milchsäure-Ammoniaknährboden gutes Wachstum zeigte, wurde für diesen Zweck ausgesucht. Ueber die Zusammensetzung des Milchsäure-Ammoniaknährbodens und über die Zuchtbedingungen finden sich eingehende Angaben in den oben erwähnten Arbeiten von H. Braun und C. E. Cahn-Bronner, auf welche, um Wiederholungen zu vermeiden, verwiesen sei.

Wir züchteten diesen Stamm sowohl im aktiven wie inaktiven Kaninchenserum. Die Züchtung im aktiven Serum stieß auf Schwierigkeiten. Das normale Kaninchenserum tötete den verwendeten Stamm. Im inaktiven Kaninchenserum ließ er sich dagegen ohne Schwierigkeiten züchten. Einer der Versuche möge als Beispiel angeführt werden:

Frisch gewonnenes Kaninchenserum wurde in Reagenzröhrchen je 1 ccm verteilt, $^1/_2$ Std. auf 56° im Wasserbade erhitzt und dann in den Brutschrank gestellt, um auf Sterilität geprüft zu werden. Selbstverständlich wurden nur sterile Serumröhrchen benutzt. Wurden solche Röhrchen mit dem verwendeten Shiga-Kruse-Stamm beimpft, so wuchs er darin gut. Meist haben wir von Röhrchen zu Röhrchen 3 Oesen verimpft. Schon nach 24 Std. war das inaktive Serum trüb und enthielt reichlich gramnegative Stäbchen. Auf diese Weise wurde der Stamm in zahlreichen Passagen gezüchtet. Von Zeit zu Zeit wurde aus den verschiedenen Passagen die Kultur auf Ammoniak-Assimilation untersucht, und zwar so, daß wir entweder direkt aus der Serumkultur in den Milchsäure-Ammoniaknährboden verimpften oder aus der Serumkultur zunächst eine Schrägagarkultur angelegt haben, von welcher erst die Milchsäure-Ammoniaknährlösung beimpft wurde. Diesen letzteren Weg wählten wir deshalb, weil gelegentlich das Wachstum in dem künstlichen Nährboden bei direkter Abimpfung von 1 bis 2 Oesen aus der Serumkultur ausblieb, während es eintrat, wenn die Beimpfung von der eingeschalteten Agarkultur erfolgte. Aus den Untersuchungen von H. Braun und C. E. Cahn-Bronner

geht hervor, daß zum Züchten der Bakterien in künstlichen Nährböden stets eine größere Einsaat nötig ist, als dies für die gewöhnlichen bouillonhaltigen Nährböden nötig ist. Eine Oese Serumkultur enthält viel weniger Keime als eine Oese Agarkulter. Deshalb gingen die Zuchten im Milchsäure-Ammoniaknährboden bei kleiner Einsaat aus der Serumkultur nicht an. Die direkten Abimpfungen von den Serumkulturen in den Milchsäure-Ammoniaknährboden waren aber dann regelmäßig von Erfolg begleitet, wenn mehrere Oesen, 4—5, übertragen wurden.

Die Prüfungen auf Ammoniak-Assimilation wurden aus der 20., 22., 24., 30., 40. und 45. Serumpassage ausgeführt. Stets trat das Wachstum im Milchsäure-Ammoniaknährboden ein. Trotz der zahlreichen Serumpassagen gelang es also nicht, den ammoniakassimilierenden Shiga-Kruse-Stamm in einen nichtammoniakassimilierenden umzuwandeln.

Ein gleiches Ergebnis lieferten Versuche mit einem zweiten ammoniakassimilierenden Shiga-Kruse-Stamm, der nach 24 Passagen im inaktiven Kaninchenserum ohne weiteres im Milchsäure-Ammoniaknährboden wuchs.

Wie wir schon oben gesagt haben, stieß die Züchtung des Shiga-Kruse-Bazillus im aktiven Kaninchenserum auf Schwierigkeiten. Es wollte uns zunächst nicht gelingen, ihn gegen die bakterizide Serumwirkung zu festigen, und die Dysenteriebazillen auf diese Weise im aktiven Serum zu züchten, wenn wir direkt von einer Agarkultur in aktives Serum impften.

Wir versuchten deshalb, die Kultur im aktiven Serum auf die Weise zu erreichen, daß wir von Zuchten im inaktiven Serum ausgingen und die Abimpfungen nicht sofort in reines aktives Serum vornahmen, sondern das letztere zunächst mit Bouillon verdünnten und im Laufe der Passagen immer größere Mengen des aktiven Serums und geringere Bouillonmengen wählten. Auf diese Weise gelang es uns in der Tat, den Shiga-Kruse-Bazillus gegen die bakterizide Wirkung des Kaninchenserums allmählich zu festigen und ihn zum Schluß im unverdünnten, aktiven Serum zu züchten. Ein Versuch möge kurz besprochen werden:

Von der 10. Passage der inaktiven Serumkultur impften wir in ein Röhrchen, enthaltend 0,5 ccm aktives Kaninchenserum + 0,5 ccm steriler Bouillon ab. Nach 24stünd. Bebrütung war das Nährmedium bereits trüb und enthielt eine Reinkultur von Shiga-Kruse-Bazillen. Von diesem Röhrchen wurden 3 Oesen in eine Nährflüssigkeit gleicher Zusammensetzung abgeimpft. Nach 48stünd. Bebrütung wurde weiter in ein Röhrchen abgeimpft, das 0,6 ccm aktives Kaninchenserum + 0,4 ccm Bouillon enthielt; von diesem in ein Röhrchen mit 0,8 ccm Kaninchenserum + 0,2 ccm Bouillon, von diesem in ein 0,9 ccm aktives Kaninchenserum + 0,1 ccm Bouillon enthaltendes, dann in ein Röhrchen enthaltend 1 ccm aktives Kaninchenserum + 3 Tropfen Bouillon. Von dieser Kultur impften wir einerseits in reines Kaninchenserum, anderseits in 1 ccm Kaninchenserum + 3 Tropfen Bouillon. In reinem Kaninchenserum starben die Bakterien ab, ließen sich dagegen in 1 ccm Kaninchenserum, dem 3 Tropfen Bouillon zugesetzt waren, in Passagen züchten. In dem letzteren Medium haben wir den Stamm zunächst weiterhin 13 Passagen hindurch gezüchtet. Von der 13. Passage in diesem Medium ab ließ er sich im bouillonfreien, aktiven Serum längere Zeit hindurch züchten.

Wir prüften nun die 15., 25., 30. und 34. Passage im aktiven Serum auf Ammoniak-Assimilation, und zwar sowohl durch direkte Abimpfung aus der Serumkultur in die Milchsäure-Ammoniaknährlösung als auch durch Vermittlung einer eingeschalteten Agarpassage. Die Versuche ergaben, daß durch die Züchtung im aktiven Serum die Fähigkeit, Ammoniak zu assimilieren, nicht verloren geht.

Versuche mit einem zweiten ammoniakassimilierenden Shiga-Kruse-Stamm führten zu dem gleichen Ergebnis.

Wir konnten also in diesen Versuchen keine Stütze für die Annahme gewinnen, daß die Ammoniak-Assimilation bei der Züchtung der Shiga-Kruse-Bazillen in tierischen Flüssigkeiten eingebüßt wird.

Die weitere Aufgabe, die wir uns gestellt haben, war die, ob durch die Züchtung im aktiven und inaktiven Serum und unter den primitiven Verhältnissen im Milchsäure-Ammoniaknährboden eine Veränderung des Shiga-Kruse-Bazillus in antigener Hinsicht eintritt. Wir beschränken uns dabei auf die Untersuchung der agglutinogenen Eigenschaften.

Aus den Untersuchungen von H. Braun und M. Feiler (6) an Typhusbazillen wissen wir, daß diese Mikroorganismen bei fortgesetztem Wachstum im inaktiven Kaninchenserum schwer agglutinabel werden, dagegen ihre Empfindlichkeit gegenüber den bakteriziden Serumkräften beibehalten. Umgekehrt gewinnen diese Mikroorganismen bei Züchtung im aktiven Serum eine Bakterizidiefestigkeit, die Agglutinabilität bleibt aber erhalten. Was das antigene Verhalten der Mikroorganismen bei Züchtung in künstlichen Nährböden anbetrifft, so lehrten die Untersuchungen an Paratyphus B-Bazillen von H. Braun und C. E. Cahn-Bronner, daß qualitative Veränderungen im Rezeptorenapparat gegenüber den in Bouillon gezüchteten Bakterien nicht eintreten, daß dagegen quantitative Verschiebungen der verschiedenen Rezeptoren nachweisbar sind. Wie H. Braun (7) in Gemeinschaft mit M. Feiler (8), H. Schaeffer (9) und Nodake (10) gezeigt hatte, ist das Ektoplasma peritrich begeißelter Bakterien serologisch vom Endoplasma different. In nährstoffreichen bouillonhaltigen Nährböden sind die Paratyphus B-Bazillen kürzer und plumper, in Nährböden, die nur wenige Nährstoffe enthalten, wie z. B. im Milchsäure-Ammoniaknährboden, sind sie meist länger und schlanker. Das Verhältnis vom Ekto- zum Endoplasma der Bakterien ist also in den verschiedenen Nährböden ein verschiedenes, wodurch sich die Menge der Ektoplasma-Agglutinogene zu der Menge der Endoplasma-Agglutinogene ändert.

Wir haben die 32., 41. und 45. Passage im inaktiven Serum des einen von uns untersuchten Shiga-Kruse-Stammes auf Agglutinabilität untersucht und mit der des Ausgangsstammes, der fortlaufend auf Schrägagar gezüchtet war, verglichen. Die Versuche wurden so ausgeführt, daß wir aus den Serumpassagen Schrägagarröhrchen beimpften und mit den Agarkulturen die Agglutinationsprüfung vornahmen. Die Versuche zeigten, daß die Agglutinabilität des im inaktivierten Serum gezüchteten Stammes nicht eingebüßt wurde, aber abgenommen hat.

Auch die im aktiven Serum gezüchteten Shiga-Kruse-Bazillen prüften wir auf Agglutinabilität, und zwar verschiedene Passagen dieser Zuchten. Hier ließ sich ebenfalls eine Abnahme der Agglutinabilität feststellen.

Ein besonders starker Verlust der Agglutinabilität war bei solchen Bakterien nachweisbar, die längere Zeit hindurch im Milchsäure-Ammoniaknährboden gezüchtet wurden.

Wir bedienten uns dabei einer Nährlösung, die folgendermaßen hergestellt war: Wir lösten in 200 ccm doppelt destillierten Wassers

1 g NaCl, 1 g Ammoniumsulfat, 0,025 g Magnesiumsulfat, 0,4 g Kaliumbiphosphat und 1 g Ammoniumlaktat. Diese Lösung wurde mit Sodalösung neutralisiert. In späteren Passagen verwendeten wir eine Nährlösung, die statt 0,4 g Kaliumbiphosphat ein Gemisch von primärem und sekundärem Kaliumphosphat enthielt, und zwar 0,1 g primäres + 0,3 g sekundäres Kaliumphosphat. Dann besitzt die Lösung bereits die brauchbare Wasserstoffionenkonzentration und muß nicht mit Sodalösung neutralisiert werden. Von dieser Nährlösung gaben wir in kleine Erlenmeyer-Kölbchen 7—10 ccm.

Im Laufe der zahlreichen Passagen im Milchsäure-Ammoniaknährboden konnte eine Veränderung des Shiga-Kruse-Bazillus in kultureller Hinsicht nicht festgestellt werden. Er zeigte stets dieselben morphologischen und ernährungsphysiologischen Eigenschaften wie der Ausgangsstamm. Die Milchsäure-Ammoniak-Kulturen haben aber ihre Agglutinabilität eingebüßt. Als Beispiel des Verhaltens des im inaktiven und aktiven Serum und im Milchsäure-Ammoniaknährboden gezüchteten Stammes möge folgender Versuch angeführt werden:

Tabelle.

Versuch a).

Zum Versuch wurde benutzt:

1) Immunserum, gewonnen von Kaninchen durch Injektion mit Aether abgetöteten Agarkulturen des Shiga-Kruse-Bazillus.

2) Kulturen:

a) Agarkultur des Ausgangsstammes,

b) Agarkultur, gewonnen aus der 33. Passage des Shiga-Kruse-Stammes im inaktiven Kaninchenserum,

c) Agarkultur, gewonnen aus der 18. Passage im aktiven Kaninchenserum.

Von den Agarkulturen wurden mit physiologischer Kochsalzlösung Aufschwemmungen gemacht, und zwar wurde je ein Agarröhrchen in 5 ccm Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Das Ergebnis des Agglutinationsversuchs nach 2 Std. Brutschranktemperatur und 20 Std. Zimmertemperatur war folgendes:

Serumverdünnung	Ausgangsstamm	33. Passage im inaktiven Serum	18. Passage im aktiven Serum
1:100	++	++	+++
1:200	+	+	+
1:400	+	0?	0
1:800	schw. +	0	0
1:1600	(+)	0	0
Kontrolle	0	0	0

Erklärung der Bezeichnungen:

+++ heißt: vollständige Klärung der überstehenden Flüssigkeit, reichlich Flocken im Bodensatz; ++ heißt: fast vollständig klar, reichlich Flocken im Bodensatz; + heißt: überstehende Flüssigkeit trüb; Flocken mit bloßem Auge sichtbar; schwach + heißt: trüb, Flocken eben sichtbar; (+) heißt: Flocken nur mit der Lupe sichtbar; 0 heißt: keine Agglutination; 0? heißt: fragliche Agglutination.

Versuch b).

Zum Versuch wurde benutzt:

1) Agglutinierendes Shiga-Kruse-Immunserum, gewonnen von Kaninchen,

b) Eine Agarkultur, beimpft von der 41. Passage im Milchsäure-Ammoniaknährboden.

Versuchsanordnung wie in Versuch a).

Serumverdünnung	Ausgangsstamm	Milchsäure-Ammoniakkultur
1:100	+++	0
1:200	+	0
1:400	+	0
1:800	schw. +	0
1:1600	(+)	0
Kontrolle	0	

Es erhebt sich nun die Frage, ob es sich bei der verminderten Agglutinabilität der im inaktiven und aktiven Serum und bei der Inagglutinabilität der im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden gezüchteten Shiga-Kruse-Bazillen um einen Verlust von Agglutinogenen handelt, oder ob die Unausflockbarkeit dadurch zustande kommt, daß zwar die Agglutinine von den Bakterien gebunden werden, aber der physikalische Vorgang der Fällung ausbleibt. Um diese Frage zu beantworten, wurden einerseits Absorptionsversuche nach Castellani ausgeführt und andererseits Immunisierungen mit dem in agglutinablen, in künstlichen Nährböden gezüchteten Stämmen vorgenommen. Ueber diese Versuche möge kurz berichtet werden.

Was zunächst die Absorptionsversuche mit dem im inaktiven Serum gezüchteten Stamm betrifft, so hatte sich gezeigt, daß derselbe in der 43. Passage noch imstande ist, Agglutinine aus dem Immunserum zu binden.

Auf die Wiedergabe der Versuche, die nach der üblichen Methode ausgeführt worden sind, kann verzichtet werden.

Ein Absorptionsversuch, der mit der 22. Passage des im aktiven Serum gezüchteten Stammes ausgeführt wurde, ergab ebenfalls, daß solche Bakterien die Agglutinine des Immunserums zu binden imstande sind.

Es konnte also nicht festgestellt werden, daß die mangelhafte Agglutinabilität der im aktiven und inaktiven Serum gezüchteten Shiga-Kruse-Stämme in einer nachweisbar verminderten Agglutininbindung beruht.

Die Versuche, die wir mit dem im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden gezüchteten Stamm ausführten, zeitigten andere Ergebnisse. Der Castellanische Versuch ergab, daß solche Mikroorganismen nicht imstande sind, aus einem Immunserum Agglutinine zu binden. Das berechtigte zu der Annahme, daß die Inagglutinabilität der Milchsäure-Ammoniakkultur auf Agglutinogenverlust zurückzuführen ist. Um diese Frage zu entscheiden, wurden Immunisierungen vorgenommen. 2 Kaninchen erhielten 6 subkutane und 1 intravenöse Injektion von mit Aether abgetöteten Agarkulturen, gewonnen aus der 36. Passage im Milchsäure-Ammoniaknährboden. Während Tiere, die mit dem auf gewöhnlichem Nähragar fortgezüchteten Ausgangsstamm gut wirksame agglutinierende Sera lieferten, gelang es bei den mit Milchsäure-Ammoniak-Kulturen injizierten Tieren nicht, Agglutinine zu erzeugen, weder gegen die Milchsäure-Ammoniakkultur noch gegen den auf Nähragar fortgezüchteten Ausgangsstamm.

Fassen wir die Ergebnisse der Versuche zusammen, so ergibt sich folgendes:

1) Durch Züchtung von ammoniakassimilierenden Shiga-Kruse-Bazillen im aktiven und inaktiven Kaninchenserum läßt sich ein Verlust der Ammoniak-Assimilation nicht nachweisen. — 2) Die im inaktiven und aktiven normalen Kaninchenserum gezüchteten Shiga-Kruse-Bazillen zeigen nach einer Reihe von Passagen eine verminderte Agglutinabilität. Die Bindungsfähigkeit solcher schwer agglutinabler Bakterien für Agglutinine bleibt erhalten. — 3) Längere Zeit im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden gezüchtete Shiga-Kruse-Bazillen können ihre Agglutinabilität verlieren. Solche Bakterien sind nicht imstande, Agglutinine zu binden und im Tierkörper Agglutinine zu bilden. Es handelt sich hier also um eine echte Inagglutinabilität. Kulturelle Eigenschaften ändern sich nicht.

Literatur.

1) van Loghem, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 57. 1911. — 2) B. Kisch, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 82. 1919. — 3) H. Braun und C. E. Cahn-Bronner, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 86. 1921; Biochem. Zeitschr. Bd. 131. 1922. — 4) F. H. Ter Poorten, Doktor-Dissert. Amsterdam, 1920. — 5) Tan Ping Je, Doktor-Dissert. Amsterdam. 1921. — H. Braun und M. Feiler, Zeitschr. f. Immunitätsf. Bd. 21. 1914; Bd. 24. 1915. — 7) H. Braun, Zeitschr. f. allgem. Physiol. Bd. 19. 1920. — 8) M. Feiler, Zeitschr. f. Immunitätsforschung. Bd. 29. 1920. — H. Braun und H. Schaeffer, Berl. klin. Woch. 1918. Nr. 18; Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. 89. — 10) H. Braun und R. Nodake, Klin. Woch. Bd. 3. 1924; Centralbl. f. Bakt. Bd. 92. 1924; Zeitschr. f. Immunitätsf. Bd. 41. 1924.

Geflügelspirochätose in Oesterreich.

III. Mitteilung.

[Aus der Station für Tierseuchendiagnostik an der staatl. Tierimpfstoffgewinnungsanstalt in Mödling bei Wien.]

Von Dr. F. Gerlach, und Dr. Jos. Michalka,
Direktor wissenschaftlichem Hilfsarbeiter.

Mit 5 Tafeln.

Ueber histologische Befunde an Präparaten, die nach dem Silberimprägnationsverfahren von Levaditi hergestellt worden waren, wurde in den vorhergehenden Mitteilungen in diesem Centralblatte durch einen von uns (G.) bereits berichtet.

Ergebnisse eingehenderer pathologisch-histologischer Studien, die übrigens eine Reihe von uns erhobener Befunde unerwähnt lassen, liegen nur spärlich vor.

Wir verzeichnen daher nachstehend unsere Befunde, die wir an fast sämtlichen Organen von 17 an Geflügelspirochätose erkrankten und verendeten Hühnern erhoben haben.

Bei den in Zelloidin eingebetteten Organteilen wurden überwiegend die Hämalaun-Eosin-Färbung und die Weigertsche Fibrinfärbung nach

Vorfärbung mit Boraxkarmin, bei Gefrierschnitten Fettfärbungen mit Sudan III oder Scharlach R angewendet. Zur histologischen Untersuchung gelangten die nachstehend benannten Organe: Leber, Milz, Nieren, Lunge, Gehirn, Rückenmark, Dünn- und Dickdarm, Eierstöcke und Hoden.

In histologischen Schnitten der verschiedensten Organe spirochätosekranker Hühner erweisen sich vor allem die Gefäße, und zwar zumeist die kleineren, krankhaft verändert, wofür als Ursache eine Schädigung der Gefäßwand durch die Spirochäten anzunehmen sein dürfte. Besonders deutlich ausgeprägt waren diese Veränderungen an den Gefäßen in unseren Fällen in Leber-, Milz- und Lungenschnitten. Die übrigen von uns in den einzelnen Organen aufgefundenen, weiter unten zur Besprechung gelangenden pathologisch-histologischen Veränderungen scheinen von der Gefäßerkrankung ihren Ausgang zu nehmen oder doch zumindest in innigem Zusammenhang mit ihr zu stehen.

Was zunächst die Gefäßveränderungen betrifft, so fällt vor allem die Anhäufung von Rundzellen (Fig. 1 u. 3) und eine reichliche Ausscheidung von Fibrin (Fig. 11) in der Umgebung der Gefäße am meisten auf. Manche Blutgefäße erscheinen auf weite Strecken hin von solchen Fibrinausscheidungen und Rundzellenanhäufungen, die mehr oder minder massig auftreten können, mantelförmig eingeschlossen. Dabei werden Veränderungen der Gefäßwand selbst oft vollkommen vermißt.

In vielen Fällen hingegen bemerkt man dem Gefäßendothel unmittelbar aufsitzende, anscheinend aus Endothelzellen hervorgegangene, große, vielgestaltige Zellen mit einem oder mehreren bläschenförmigen Kernen (ein- und mehrkernige Fibroblasten), die sich zu Verbänden (Granulationsgewebe) zusammenschließen (Fig. 5 u. 8). Eine solche vom Gefäßendothel ausgehende Bildung von Granulationsgewebe erfolgt gewöhnlich unregelmäßig und nur selten in konzentrischer Anordnung. Das Endothel der Gefäße ist dabei entweder unversehrt oder aber an manchen Stellen durch Fibroblasten verdrängt. Häufig werden infolge der Entwicklung solchen Granulationsgewebes die Gefäßlumina erweitert. In Leber, Milz und Lunge haben wir nicht selten kleine Blutgefäße angetroffen, deren Lumen durch Granulationsgewebe, in welchem zahlreiche Riesenzellen enthalten waren, vollkommen obliteriert erschien (Fig. 5, 6 u. 7). Thrombosierungen von Gefäßen wurden wiederholt angetroffen, wobei häufig zwischen dem Thrombus und der Gefäßwand ein Kranz von Riesenzellen auffiel.

Die Leber spirochätosekranker Hühner läßt mikroskopisch mehrfache Veränderungen erkennen. Am hervorstechendsten treten neben den bereits oben erwähnten perivaskulären lymphozytären Infiltraten zahlreiche im Interstitium und im Leberparenchym zerstreut liegende Rundzellenanhäufungen in Erscheinung. Daneben finden sich in der Leber Nekrosen vor, die namentlich die Randpartien dieses Organs betreffen und die stets von Gefäßen ihren Ausgang zu nehmen scheinen (Fig. 1). In den ersten Stadien erscheinen die Gefäße bloß von einem mehr oder weniger schmalen Saum nekrotischen Gewebes umgeben. Die Nekrose vollzieht sich unter Quellung und allmählichem Abblassen und Verschwinden der Kerne (Karyolyse), selten nur unter Kernzerfall (Karyorrhexis). Die Konturen der Leberzellen, die in ihrem Verband gelockert erscheinen, bleiben dabei oft längere Zeit hindurch erhalten. Häufig jedoch erscheint das Plasma der Zellen in größerer

Ausdehnung zu einer formlosen, homogenen Masse verquollen. Abscheidungen von Fibrin zwischen den der Nekrose anheimgefallenen Zellen und in großen Massen zu Haufen angeordnete Rundzellen inmitten der Nekroseherde wurden wiederholt beobachtet. In den Randpartien der nekrotischen Leberteile tritt mitunter Verfettung der Leberzellen ein. Eine sehr verschieden stark entwickelte Zone von Granulationsgewebe mit eosinophilen Zellen und einer ausgesprochenen Neigung zur Bildung von Riesenzellen, scheint eine Abtrennung der nekrotischen von den gesunden Gewebsanteilen zu bezwecken (Fig. 3). Nicht unerwähnt bleiben soll eine sich entweder über die ganze Leber erstreckende oder nur herdweise auftretende Verfettung der Leberzellen, wobei deren Kerne abgeflacht und an die Wand gedrängt erscheinen.

Die schon makroskopisch auffallende Milzschwellung ist bedingt durch eine ansehnliche Vergrößerung der Milzfollikel, in denen vielgestaltige, große Zellen mit bläschenförmigen Kernen auftreten (Makrophagen, Levaditi, Manouelian) (Fig. 2). Im Plasma dieser Zellen werden häufig Fettkügelchen angetroffen (Fig. 9). Fibrin wird in den Follikeln in größeren Mengen nahezu regelmäßig in der Umgebung von Gefäßen, namentlich um die Zentralarterien, ausgeschieden (Fig. 11). Während in jüngeren Stadien der Erkrankung die Milzfollikel noch deutlich zu erkennen sind, erscheinen ihre Grenzen späterhin immer undeutlicher und oft nahezu vollständig verschwommen. Eine häufige Erscheinung in der Milz spirochätosekranken Geflügels sind zahlreiche disseminierte, kleine und größere Nekrosen, in denen Fibrin abgeschieden wird und die unzweifelhaft von Gefäßen ihren Ausgang nehmen. Im übrigen weisen die Nekrosen hier die gleiche Beschaffenheit auf wie die vorhin angeführten in der Leber.

In den Nieren trifft man hauptsächlich Rundzelleninfiltrate in den Interstitien und häufig starke Hyperämie an. Nicht selten finden sich Fetttröpfchen in der Bowmanschen Membran mancher Glomeruli und im Epithel einzelner Harnkanälchen (Fig. 10). Die Glomeruli sowie das übrige Nierengewebe erweisen sich frei von krankhaften Veränderungen.

Die Lungen sind ausnahmslos stark hyperämisch und ödematös. In manchen Lungenpartien finden sich außerdem von einem Kranz von Riesenzellen umsäumte Nekrosen vor (Fig. 4), die vollständig mit jenen in Milz und Leber übereinstimmen und Gefäßveränderungen von der gleichen Art, wie die bereits oben beschriebenen.

Im Gehirn und Rückenmark waren in unseren Fällen von Geflügelspirochätose, trotz sorgfältigster Untersuchung von Schnittserien sämtlicher Abschnitte dieser Organe, außer vereinzelten kleinen perivaskulären Infiltraten krankhafte Veränderungen nicht nachweisbar.

Dünn- und Dickdarm zeigen in Uebereinstimmung mit den klinischen und pathologisch-anatomischen Befunden regelmäßig mehr oder weniger hochgradig katarrhalisch-entzündliche Erscheinungen mit Nekrose und Abstoßung des Epithels und selbst ganzer Darmzotten. Hyperämie und stellenweise zellige Infiltration der Darmschleimhaut bilden konstante Befunde.

Die Keimdrüsen (Eierstock und Hoden) scheinen bei Spirochätose von pathologisch-histologischen Veränderungen frei zu bleiben.

Literatur.

Levaditi u. Manouelian, in Menses Handbuch der Tropenkrankheiten, 1921. (Knuth, P., u. Du Toit, P. J., Geflügelspirochätose.) — Baumann, Untersuchungen über Geflügelspirochätose. (Wien. tierärztl. Mft. August 1925.)

Erklärung der Tafelabbildungen.

Fig. 1. Leber. Uebersichtsbild. Hämalaun-Eosinfärbung. (Vergr. 85fach.) Rundzelleninfiltrate um Gefäße (*J*), Nekroseherde (*N*).

Fig. 2. Milz. Uebersichtsbild. Hämalaun-Eosinfärbung. (Vergr. 85fach.) Stark vergrößerte Follikel mit zentraler Nekrose.

Fig. 3. Leber. Hämalaun-Eosinfärbung. (Vergr. 42fach.) Nekrosen mit einem Wall von Riesenzellen (*N*), perivaskuläre Infiltrate (*J*).

Fig. 4. Lunge. Hämalaun-Eosinfärbung. (Vergr. 42fach.) Nekrosen von Riesenzellen umsäumt (*N*).

Fig. 5 u. 6. Lunge. Hämalaun-Eosinfärbung (Vergr. 110fach.) Zwei Riesenzellen (*R*) an der Innenwand eines großen Gefäßes. Durch Riesenzellen obliterierte Gefäße (*G*).

Fig. 7. Milz. Hämalaun-Eosinfärbung. (Vergr. 380fach.) Obliteriertes Gefäß. Ein Kranz von Riesenzellen dem Endothel aufsitzend.

Fig. 8. Leber. Hämalaun-Eosinfärbung. (Vergr. 42fach.) Bildung von Granulationsgewebe (*GG*) an der Innenwand eines Lebergefäßes.

Fig. 9. Milz. Hämatoxylin-Sudan III-Färbung. (Vergr. 110fach.) Fetteinlagerung erfolgt hauptsächlich in den Makrophagen.

Fig. 10. Niere. Hämatoxylin-Sudan III-Färbung. (Vergr. 160fach.) Fetteinlagerung in der Bowmanschen Kapsel der Glomeruli und in den Epithelien einzelner Tubuli.

Fig. 11. Milz. Weigertsche Fibrinfärbung. (Vergr. 110fach.) Fibrin hauptsächlich unter der Kapsel um die Gefäße und in den Nekrosen.

Kritik und Diagnose der „Zelleinschlussbildung"[1]).

Von **B. Lipschütz.**

Vor mehreren Jahren hatte ich den Versuch unternommen[2]), entsprechend dem damaligen Stande unserer Kenntnisse, das Wesentlichste über die Entstehung und den Bau der „Zelleinschlüsse" auf Grund eigener Erfahrungen und gestützt auf in der Literatur sich vorfindende Angaben, zusammenzufassen. In der genannten Arbeit konnte ich ferner ein auf dem charakteristischen zelltopographischen Verhalten der „Einschlüsse" fußendes „System der Chlamydozoa-Strongyloplasmen" aufstellen und die „Einschlüsse", je nach ihrer Wertigkeit, bezw. je nach Bau und Herkunft in solche erster und zweiter Ordnung einteilen. In den letzten Jahren hat nun das früher stark vernachlässigte Studium der „Zelleinschlüsse" weitere Fortschritte, namentlich in der Herpes- und Zosterforschung, gemacht und bei einigen infektiösen Dermatosen war ich in der Lage gewesen, über neue, im Sinne der Chlamydozoenlehre zu deutende Befunde zu berichten (Condyloma acuminatum, Verruca vulgaris).

Wie nicht anders zu erwarten war, sind bei der außerordentlichen Verschiedenheit der Befunde und der Kompliziertheit des Arbeits-

---

1) Erweiterte Diskussionsbemerkungen in der Path. Ges. Wien 26. 2. 1925.

2) II. Mitteilung über Chlamydozoa-Strongyloplasmen. (Wien. klin. Woch. 1919. Nr. 47.)

Fig. 1.

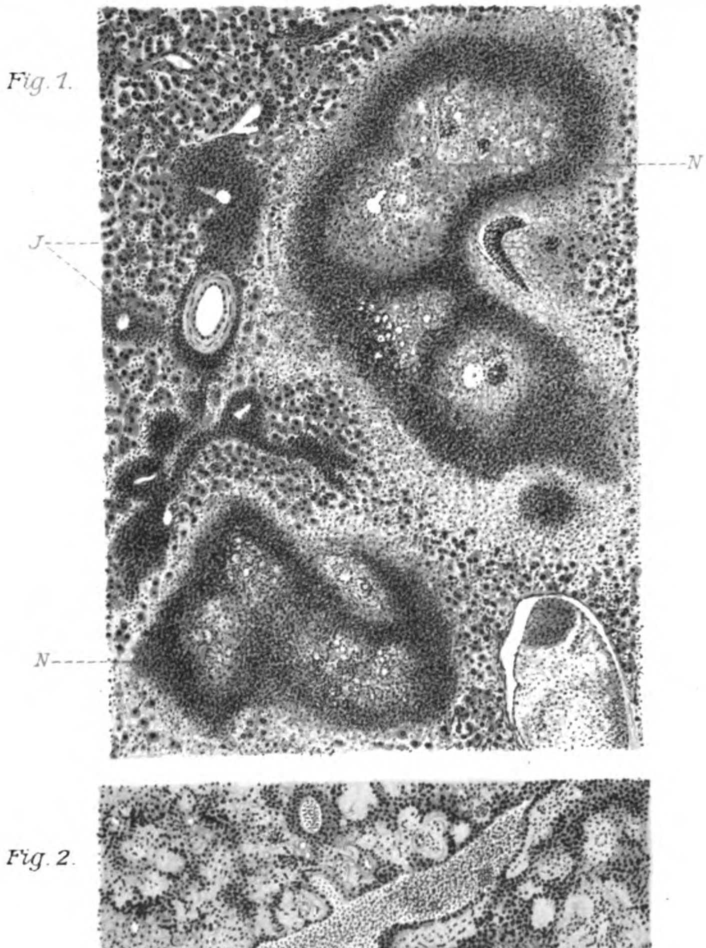
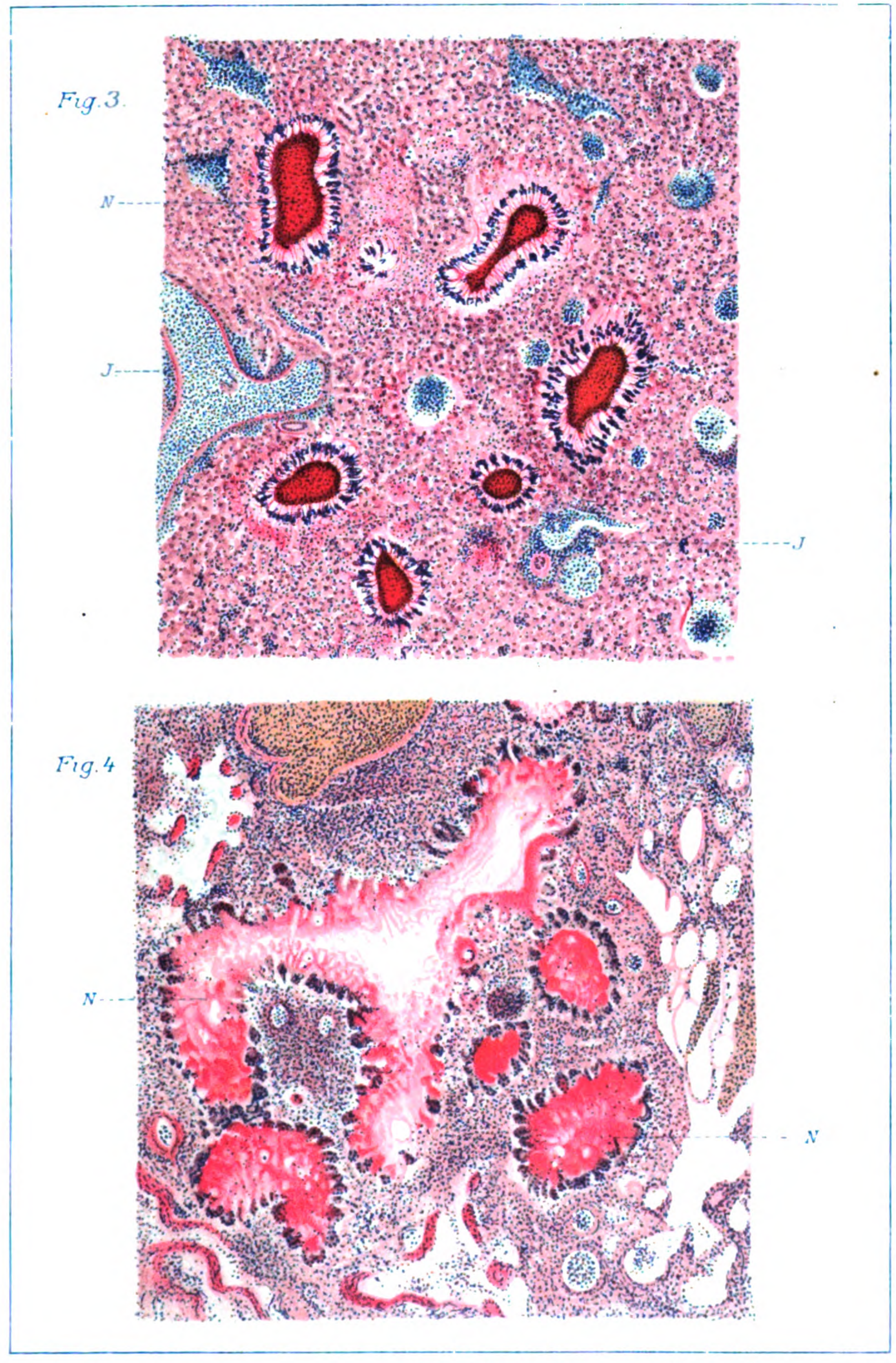


Fig. 2.


Fig. 3.
N
J
J
Fig. 4
N
N

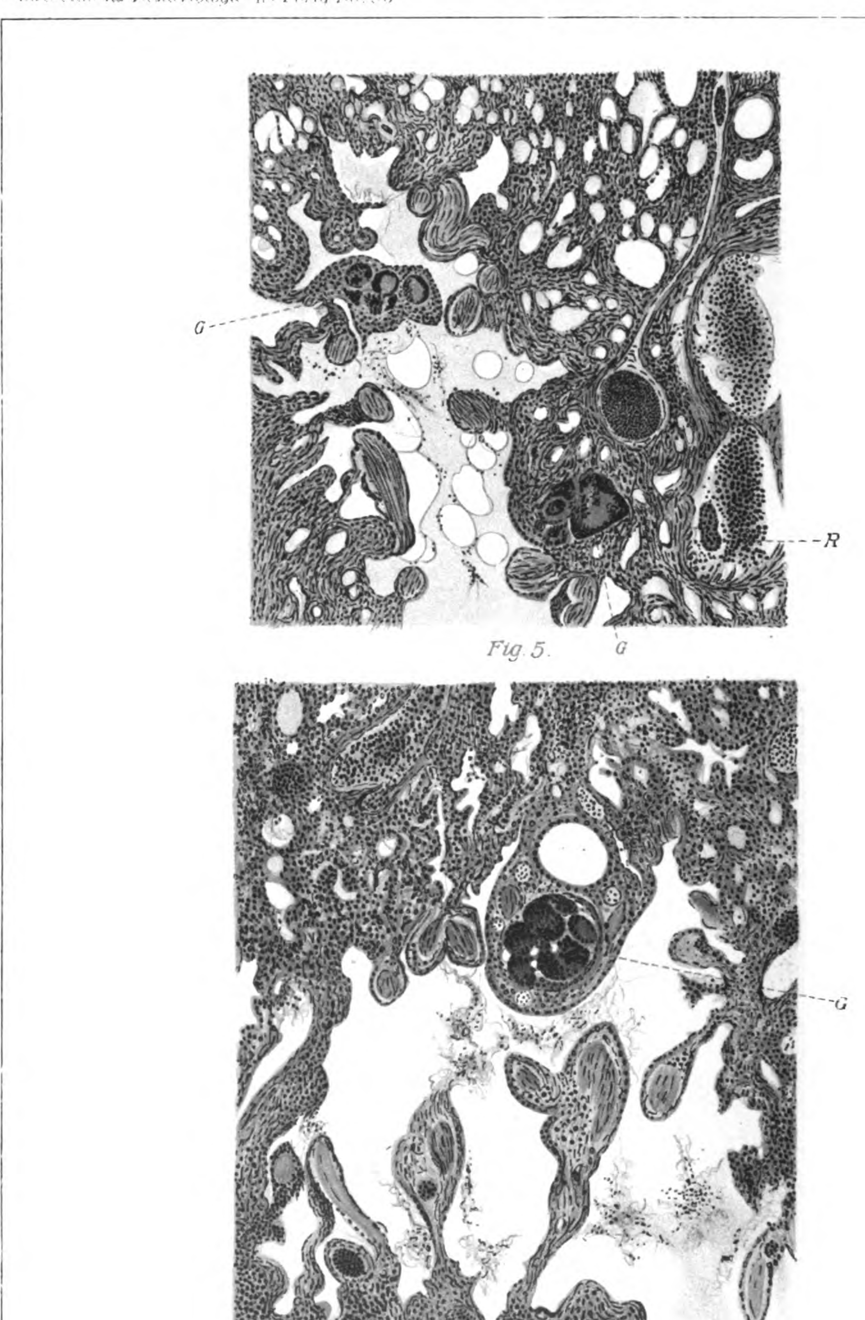


Fig. 5.

Fig. 6.

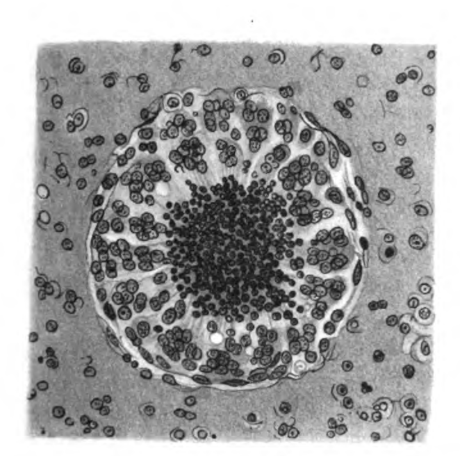


Fig. 7.

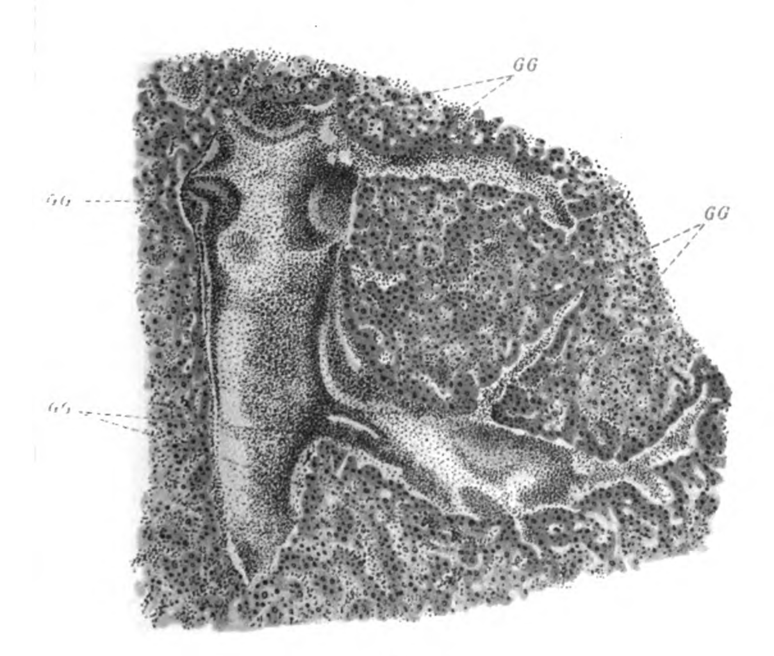


Fig. 8

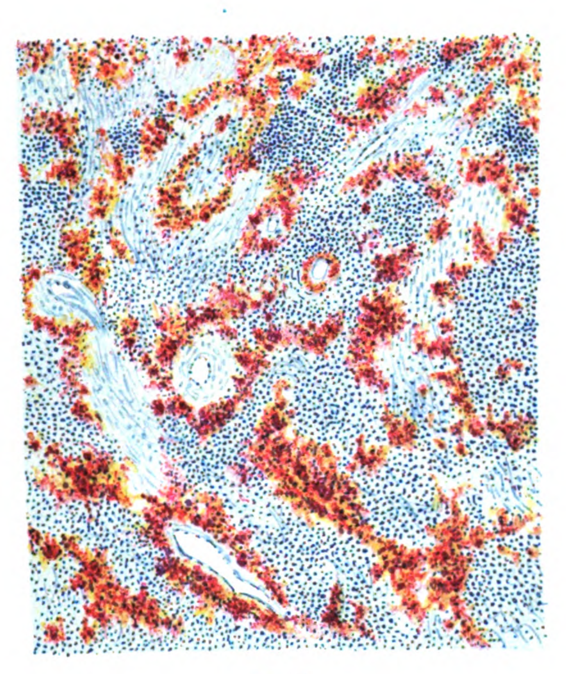


Fig 9

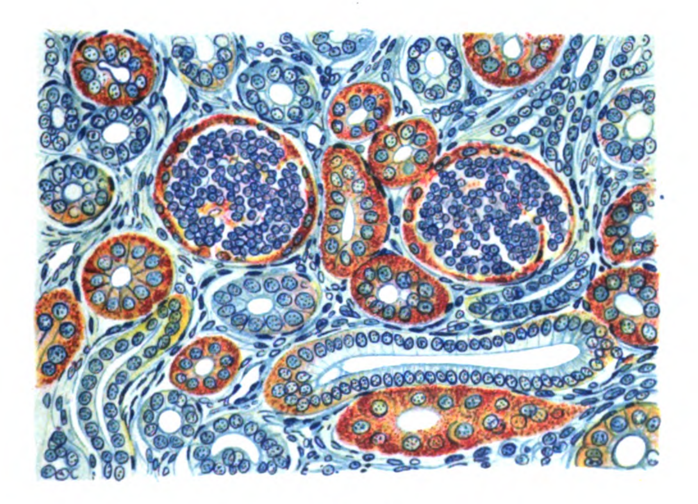


Fig 10.

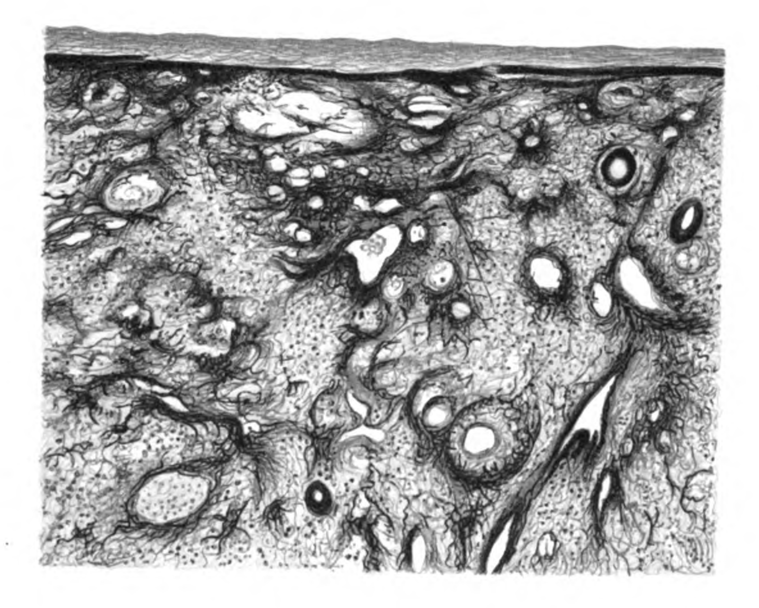


Fig 11.

gebietes allseits übereinstimmende Auffassungen über die ansonsten objektiv leicht und regelmäßig nachzuweisenden Befunde bisher nicht erzielt worden und die in der ersten Aera der Erforschung der Guarnierischen Körper vertretenen Ansichten (Degenerationstheorie, Theorie der nukleolären Genese der „Einschlüsse“ usw.) kehren mit bemerkenswerter Einförmigkeit auch beim Studium der neueren Befunde, speziell der Karyooikongruppe, wieder. Es erscheint mir daher angebracht, auf Grund neuerer, in den letzten Jahren hauptsächlich beim Studium infektiöser Dermatosen gesammelter Erfahrungen meinen Standpunkt in der uns hier beschäftigenden Frage genau darzulegen, um hierdurch zu ihrer Klärung beizutragen.

Wenn wir die „Einschlußbildung“ im Sinne der Lehre von den Chlamydozoen und Strongyloplasmen als zelluläre Reaktion auf das eingedrungene spezifische Virus definieren, so ist schon damit klar ausgedrückt, daß es sich hier nicht allein um einen morphologischen Begriff, sondern vielmehr noch um einen zellbiologischen Vorgang handelt. Gerade das Studium eines vielseitigen Materials auf vergleichender Basis und unter verschiedenen Versuchsbedingungen erlaubt uns, den oben definierten Begriff scharf zu formulieren. Auf diese Notwendigkeit, vergleichende Untersuchungen auf möglichst breiter Grundlage auszuführen, habe ich schon zu wiederholten Malen hingewiesen, da nicht allein die Beurteilung morphologischer Zellbilder in den Vordergrund der Betrachtung gerückt werden darf, vielmehr erst die eingehende Berücksichtigung des biologischen Geschehens eine einwandfreie Deutung der „Zelleinschlußbildung“ ermöglicht. Ergebnisse tinktorieller Untersuchungen und gewisse morphologische Aehnlichkeiten mit in der Literatur sich vorfindenden Angaben über gewisse Degenerationsformen (z. B. auch der Chromatolyse Heidenhains) erscheinen mir daher keinesfalls ausreichend, um eine exakte Beurteilung der Einschlußgebilde zu ermöglichen oder einen Fortschritt auf diesem Arbeitsgebiet anzubahnen.

Die „Einschlußbildung“ ist der Ausdruck für das Vorhandensein und für die intrazelluläre Vermehrung des Virus, wovon man sich regelmäßig (Herpes, Variola, Zoster, Varicellen, Geflügelpocke usw.) experimentell überzeugen kann. Genetisch ist der „Zelleinschluß I. Ordnung“ (Lipschütz) das Produkt des von mannigfachen Reaktionsprodukten der Zelle umschlossenen Virus; je nach der näheren Beschaffenheit dieser Reaktionsprodukte zeigen bekanntlich die „Zelleischlüsse“ bei den einzelnen hierher gehörenden Krankheiten ein derart differentes Verhalten, daß wir aus ihrem Nachweis zu einer Mikrodiagnose des filtrierbaren Virus gelangen (Guarnierische Körper, Zoster-, Herpes-, Molluskumkörper usw.). Indes stellt die „Zelleinschlußbildung“ einen durchaus komplizierten Vorgang dar, und man gelangt erst auf dem Wege einer eingehenden Analyse sämtlicher ihn mitbestimmenden Faktoren zu einer Kritik desselben. Auf Grund vieljähriger eigener Erfahrungen und mit Heranziehen eines großen, von verschiedenen „Einschlußkrankheiten“, namentlich der Haut, stammenden Materials glaube ich in folgenden Punkten dieses biologische Zellphänomen auseinandersetzen zu können:

1. Die Einschlußbildung“ im Sinne der Chlamydozoenlehre, oder, noch genauer ausgedrückt, die „Einschlüsse I. Ordnung“ sind ausnahmslos eine biologische Funktion der empfänglichen Zelle auf das lebende Virus. Schaltet man den einen oder den anderen Faktor

aus, so kommt keine „Einschlußbildung“ zustande. Impft man z. B. die hochempfängliche Kaninchenkornea mit durch Erhitzen abgetöteter Vakzine, der noch bei subkutaner Injektion immunisierende Eigenschaften zukommen, so treten keine Guarnierischen Körper auf; oder impft man lebendes, vollvirulentes Herpesvirus in den (nach Teague und Goodpasture) unempfänglichen Muskel, oder auf die skarifizierte, ansonsten empfängliche Kaninchenhornhaut, die jedoch nach Ablauf einer Herpeskeratitis immun geworden ist, so bilden sich keine „Herpeskörperchen“.

2. Die „Einschlußbildung“ ist eine gesetzmäßige Funktion bloß bestimmter Gewebsanteile, z. B. bloß einzelner Anteile des befallenen Hautepithels. Dieses Moment erfolgt mit nahezu mathematischer Genauigkeit. In einer vor kurzem veröffentlichten Arbeit „Zur Kenntnis der Aetiologie und der strukturellen Architektonik der Warze“ (Arch. f. Dermat. Bd. 148. 1924) habe ich genauere Angaben über diese Lokalisation der „Zelleinschlüsse“ in den einzelnen Schichten der erkrankten Epidermis machen können, die ich hier tabellarisch anführe, um die Richtigkeit des angeführten Satzes zu veranschaulichen:

Krankheit	Basalzellenschicht	Stachelschicht	Hornschicht
Molluscum contagiosum	—	+	+
Geflügelpocke	+	+	.
Variola humana	+	+	.
Paravakzine	—	+	+
Condyloma acuminatum	+	+	.
Verruca vulgaris	—	+	+
Larynxpapillom (experim. Hundepapillom)	+	+	+

— bedeutet Fehlen, + Vorkommen der „Einschlüsse“.

Das gewebstopographische Verhalten der „Zelleinschlüsse“ in der Haut bei einer Reihe von Infektionskrankheiten weist somit auf gesetzmäßige Beziehungen zwischen „Einschlußbildung“ als Ausdruck einer bestimmten Zellfunktion und den einzelnen, die kranke Oberhaut zusammensetzenden Schichten hin. Desgleichen kann hier hinzugefügt werden, daß, während beispielsweise bei den oben angeführten Krankheiten die „Einschlüsse“ nur im Epithel vorkommen, bei einer Reihe anderer „Einschlußkrankheiten“ (z. B. Zoster, Varicellen, venerischer Herpes usw.) die Gebilde ebenso gesetzmäßig im Epithel und im Corium zur Ausbildung gelangen. Diese Tatsachen sprechen caeteris paribus gegen die Deutung dieser Gebilde als Degenerationsprodukte, denn es wäre unverständlich, warum gerade bestimmte Gewebsanteile der Haut erkranken und andere ebenso gesetzmäßig leer ausgehen.

3. Die Gesetzmäßigkeit der „Zelleinschlußbildung“ erfolgt jedoch nicht allein gewebs-, sondern auch zelltopographisch und betrifft entweder nur das Zellprotoplasma (Molluscum contagiosum, Geflügelpocke usw.), oder nur den Kern (Zoster, Varicellen, Herpes usw.), oder gleichzeitig beide Zellbestandteile (Variola, Paravakzine). Dieses, meines Erachtens besonders wichtige Kriterium habe ich, wie bereits erwähnt, in früheren Arbeiten als Grundlage für die Aufstellung eines Systems der Chlamydozoa-Strongyloplasmen herangezogen (Cytooikon-, Karyooikon- und Cytokaryooikongruppe.

4. Die „Zelleinschlußbildung“ ist ferner nicht allein eine Funktion des Virus in örtlicher (Punkt 2 und 3), sondern auch in zeitlicher Hinsicht. So konnte ich zeigen, daß die typische Kerneinschlußbildung bei der Warze (Verruca vulgaris) bloß in den allerersten Stadien derselben nachweisbar ist; bei der Keratitis herpetica des Kaninchens treten nach Impfung mit Herpes febrilis „Herpeskörperchen“ sehr frühzeitig, schon innerhalb der ersten 24 Std. auf („α-Körperchen“), während für die nach Impfung mit Material des venerischen Herpes sich ausbildenden „β-Körperchen“ das zeitliche Optimum der 3. Tag ist. Mit dem Verschwinden der „Kerneinschlüsse“ läßt sich die Keratitis nicht mehr übertragen, ein Beweis für das Bestehen inniger zeitlicher Verhältnisse zwischen Virulenz und Einschlußbildung.

5. Die „Zelleinschlußbildung“ ist durch absolute Konstanz, durch Vorkommen der „Einschlüsse“ in außerordentlich großen Mengen und, wie bereits erwähnt, durch eigenartige morphologische Bilder gekennzeichnet.

In methodischer Hinsicht sind nur Befunde zu verwerten, die von in vitro exzidiertem Material gewonnen werden; Leichenmaterial (z. B. Scharlach!) ist oft ungeeignet. Die „Einschlüsse“ zeigen in der Regel auch beträchtliche mikroskopische Größe und sind schon mit schwachen Linsen sichtbar, denn sie stellen, nach unseren Anschauungen, Riesenaggregate der Mikroben dar.

6. Von besonderem Interesse ist das färberische Verhalten der „Zelleinschlüsse I. Ordnung“, wobei es wohl überflüssig ist, hervorzuheben, daß dieses Verhalten nur auf Grund von mit verschiedenen Färbungsmethoden und bei verschiedener Fixation des Gewebes vorgenommenen Untersuchungen erschlossen werden darf. Indem ich wegen näherer Einzelheiten auf meine Arbeiten über die Zytologie zahlreicher infektiöser Dermatosen verweise, sei hier nur in aller Kürze ausgeführt, daß wir neben vorzugsweise „acidophilen“ „Einschlüssen“, wie sie z. B. im Zellprotoplasma beim Molluscum contagiosum oder im Zellkern beim Zoster regelmäßig nachzuweisen imstande sind, „Kerneinschlüsse“ bei der Warze oder beim Condyloma acuminatum kennen, die vorzugsweise Avidität zu basischen Farbstoffen zeigen. Von biologischen Gesichtspunkten ausgehend, dürfte man wohl berechtigt sein, diese färberischen Differenzen auf zellchemisch untereinander durchaus abweichende Reaktionen der erkrankten Zellen oder Zellbestandteile (Kerne) auf die Invasion der verschiedenartigen Krankheitserreger zurückzuführen. Für die Richtigkeit dieser Auffassung sprechen auch jüngst gesammelte Erfahrungen bei mehreren Affektionen, über die später an anderer Stelle berichtet werden soll.

7. Eine Reihe von „Zelleinschlüssen“ zeigen ferner auch ein bei bestimmten Untersuchngsmethoden festzustellendes strukturelles Bild, bedingt durch die Auflösung des ansonsten homogen erscheinenden „Einschlusses“ in eine Unmenge von „Elementarkörperchen“ oder Strongyloplasmen, womit der Virusnachweis im Einschluß selbst erbracht erscheint, derart, daß man wohl mit Recht von „Viruskolonien im Gewebe bzw. in der Zelle“ sprechen darf (z. B. Molluscum contagiosum — Lipschütz, Geflügelpocke — da Rocha-Lima, Herpes febrilis — Goodpasture, Zoster — Lipschütz). Ferner zeigen manche Einschlüsse“ eine sehr deutlich ausgesprochene Kapselbildung (z. B. bei Geflügelpocke [nach Giemsa-Färbung] oder die „Kerneinschlüsse“ in den Stachelzellen bei der Verruca vulgaris).

8. Die „Zelleinschlußbildung“ als Funktion des Virus ist experimentell (Vakzine, Herpes usw.) in theoretisch endlosen Passagen beim Menschen und beim Tier zu erzeugen; als Funktion nur des Virus (und nicht etwa als Reaktion auf verschiedene belebte und unbelebte Reize) ist sie experimentell und in Passagen auch mit Filtraten (somit nach vollkommener Zellausschaltung im Impfmaterial) auslösbar.

9. Bemerkenswert sind ferner die gesetzmäßigen Beziehungen zwischen „Zelleinschlußbildung“ und den Abkömmlingen der einzelnen Keimblätter, auf die ich schon in früheren Arbeiten hingewiesen habe. Beim Molluscum, bei der Warze, dem Condyloma acuminatum, beim Larynxpapillom usw. sind bloß die Zellen des äußeren Keimblattes zur „Einschlußbildung“ befähigt, während beim Zoster, bei den Varizellen, beim Herpes febrilis usw. die Zellkerne der Gewebe des äußeren und des mittleren Keimblattes der Sitz von zahlreichen „Einschlüssen“ sind. Im Sinne dieser Tatsachen erscheint die von Levaditi vertretene Anschauung von der Natur der „Ektodermosen“ und ihre Gegenüberstellung den „Mesodermosen“ unhaltbar.

10. Schließlich ist die „Einschlußbildung“, wie bereits in meiner 2. Mitteilung über Chlamydozoa-Strongyloplasmen hervorgehoben wurde, als biologische Funktion der Zelle der betreffenden Tierart zu definieren, eine auch von v. Prowazek geteilte Ansicht. Wechselt die Tierart, so können „Einschlüsse“ in Zellen auftreten, in denen sie bei anderen, gleich empfänglichen Tierspezies vermißt werden. So gelangen bei der experimentellen Affenvariola Guarnierische Körper auch im Corium zur Ausbildung (Councilman), während sie beim Menschen nur in der Epidermis zu finden sind. Bemerkenswert ist auch die Angabe Löwenthals (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. 1925), daß beim für Vakzine empfänglichen Huhn Guarnierische Körper vermißt werden.

Ueberblickt man die stattliche Anzahl von Kriterien, die zu einer eingehenden wissenschaftlichen Beurteilung des biologischen Vorganges der „Zelleinschlußbildung“ herangezogen werden müssen, und führt man grundsätzlich Untersuchungen über sie unter Heranziehen eines großen Materiales auf vergleichender Basis durch, so wird man zweifellos der Eigenart des Vorganges gerecht werden müssen und sich von den noch immer herumschwirrenden verschwommenen Ansichten von Zelldegeneration u. dgl. frei machen. Allerdings wird man in allen weiteren Untersuchungen die Forderung aufstellen müssen, den Begriff „Zelleinschluß“ im Sinne der hier gemachten Ausführungen zu berücksichtigen. Zu betonen ist hier noch, daß sich stets präformierte Zellsubstanzen am Aufbau der „Zelleinschlüsse“ beteiligen. Dementsprechend kann hie und da, beispielsweise in einem irgendwie geschädigten Zellkern, sich ein größerer Chromatinklumpen u. dgl. als Muttersubstanz des „Zelleinschlusses“ vorfinden, der auch einem solchen Gebilde ähnlich sieht, aber bei näherer Untersuchung durch alle oben angeführten Kriterien von ihm doch zu trennen ist.

Ferner muß ich an dieser Stelle anführen, daß in Arbeiten einzelner Autoren noch immer Gebilde heterogenster Art als „Einschlüsse“ beschrieben und abgebildet werden, wie z. B. Pigment- und Lipoidgranula bei Studien über Encephalitis oder tropfige Entmischung des Protoplasmas oder Karyorhexis und namentlich ausgetretene Nukleolen (Hammerschmidt). Letztere („Pseudoeinschlüsse“, „Pseudoguarnieri) treten bei den mannigfachsten Störungen des Zellebens, sowohl bei Störung der Kernplasmarelation (Hertwig) als auch der Relation

Nucleus—Nucleolus auf und sind namentlich durch chemische und Lichtschädigugen des Gewebes leicht auch experimentell zu erzeugen. Auch infektiöse Reize können zum Austreten von Nukleolen führen, wie dies Apolant für die Geflügelpocke beschrieben hat. Diese Gebilde haben jedoch mit echter „Zelleinschlußbildung", die allein für den in vorliegender Arbeit geschilderten Vorgang in Betracht kommt, nichts zu tun. Im Interesse der weiteren Erforschung der „Einschlußkrankheiten" ist eine genaue Kritik der „Zelleinschlußbildung" und eine strenge Trennung der „Zelleinschlüsse" von „Pseudoeinschlüssen" dringend notwendig.

Studien über den Mechanismus der natürlichen Immunität.

I. Mitteilung.

[Aus dem bakteriologischen Laboratorium des Medizinischen Instituts zu Odessa.]

Von Prof. **W. Jelin.**

Vorliegende Arbeit ist die 1. einer Serie von Arbeiten, die wir dem Studium des Mechanismus der natürlichen Immunität widmen. Wir haben zu diesem Zwecke im Gegensatz zu den meisten Autoren obligate Saprophyten gewählt, die in der Umwelt leben und für keine Tierspezies pathogen sind. In den Wurf kamen uns: 1) weißer Staphylokokkus, eine nicht pathogene Form, aus der Luft aufgefangen, 2) Sarzine aus der Luft — Sarcina flava, 3) Bac. mycoides roseus, 4) Bac. anthracoides. Nach vollbrachter Injektion einer Suspension der besagten Saprophyten in die Bauchhöhle eines Kaninchens begannen wir mit der Bestimmung des Zeitraums, in dem die Bauchhöhlenflüssigkeit des Kaninchens von den Saprophyten frei wird.

Die 24stündige Kultur des Versuchssaprophyten wurde mit 10 ccm physiologischer Lösung gewaschen, wobei durch Umschütteln eine gleichmäßige Emulsion hergestellt wurde, von der man ein Quantum von 3 ccm in die Bauchhöhle einführte. In bestimmten Zeitabschnitten wurde der Bauchhöhle ein geringes Quantum Flüssigkeit mittels ein und derselben Kapillarpipette entnommen und ein Tropfen dieser Flüssigkeit mit geschmolzenem Agar vermengt oder mit Hilfe eines Dri-

Versuch I.

Ein Kaninchen erhält ip. 3 ccm einer Suspension der weißen Staphylokokken. Gewachsen sind aus einem Tropfen Bauchhöhlenflüssigkeit, der Bauchhöhle entnommen:

nach 10 Min.	16 000 Kol.
„ 2 Std. 20 Min. .	5 000 „
„ 4 „ 20 „ . .	1 000 „
„ 7 „	400 „
„ 12 „	35 „

galski-Spatels ausgestrichen. Die Schalen wurden auf 24 Std. in einen Thermostat gebracht und die gewachsenen Kolonien am nächsten Tage gezählt.

Versuch II.

Ein Kaninchen erhält ip. 3 ccm Suspension von Sarzinen. Gewachsen sind aus einem Tropfen Bauchhöhlenflüssigkeit, der Bauchhöhle entnommen:

nach 10 Min.	11 000 Kol.
„ 2 Std. 10 Min. .	2 000 „
„ 4 „	400 „
„ 6 „	3 „
„ 7 „	0 „

Versuch III.

Ein Kaninchen erhält ip. 3 ccm Suspension B. mycoides roseus. Gewachsen sind aus einem Tropfen Bauchhöhlenflüssigkeit, der Bauchhöhle entnommen:

nach 10 Min.	10 000 Kol.
„ 2 Std.	3 000 „
„ 4 „	1 000 „
„ 7 „	350 „
„ 10 „	100 „
„ 12 „	9 „
„ 14 „	0 „

Versuch IV.

Ein Kaninchen erhält ip. 3 ccm Suspension B. anthracoides. Gewachsen sind aus einem Tropfen Bauchhöhlenflüssigkeit, der Bauchhöhle entnommen:

nach 10 Min.	1400 Kol.
„ 60 „	12 „
„ 90 „	0 „

Aus den Versuchsergebnissen geht hervor, daß der Zeitraum, in dem unsere Saprophyten aus der Bauchhöhlenflüssigkeit in der Reihenfolge: Bac. anthracoides, Sarzine, Bac. mycoides roseus, Staphylococcus, verschwinden, in weiten Grenzen, zwischen $1^1/_2$ bis 14 Std., schwankt.

Da die Saprophyten in das Blut nicht eindringen können, so gehen sie in der Bauchhöhle selbst zugrunde, und wenn man ihr Verschwinden nur von der Phagozytenreaktion abhängig machen will, so ist es schwer, einen Aufschluß der Tatsache zu finden, daß die Phagozyten mit den einen Saprophyten in $1^1/_2$ Std. und mit anderen erst nach 14 Std. fertig werden. Die Saprophyten sind gegen die Phagozyten alle in gleichem Maße wehrlos. Daher ist an dem Untergange der Saprophyten noch ein anderer Faktor offenbar beteiligt, und als solcher kann die Bauchhöhlenflüssigkeit angesehen werden. Zur Erforschung der Bakterizidie der Bauchhöhlenflüssigkeit gingen wir folgendermaßen vor: Aus der Bauchhöhle gewannen wir mittels einer sterilen Pipette ein wenig Flüssigkeit (1 oder 2 Tropfen), die wir in einem sterilen Uhrglas mit einem Suspensionstropfen des Versuchsmikroben in physiologischer Lösung ($^1/_{10}$ Platinöse in 10 ccm) versetzten; das Gemenge wurde wiederum in die Pipette aufgesogen, und diese nach Verschluß des Endes in den Brutschrank auf 2—3 Std. gestellt, wonach der Inhalt auf flachen Agar ausgeblasen und mit einem Drigalski-Spatel gestrichen wurde. Nach 24 Std. erfolgte die Bestimmung der Zahl der gewachsenen Kolonien. Als Kontrolle wurde ein Tropfen der gegebenen Suspension ausgesät und die Anzahl der gewachsenen Kolonien eben-

falls nach 24 Std. festgestellt. Der Vergleich der Kolonienzahl in beiden Schalen ermöglicht eine Beurteilung der Bakterizidie der Bauchhöhlenflüssigkeit.

	Versuchsschale	Kontrollschale
Staphylococcus	15 000 Kol.	10 000 Kol.
Sarzine	2 000 „	6 000 „
B. mycoid. roseus	3 000 „	2 000 „
B. anthracoides	0 „	200 „

Die Bauchhöhlenflüssigkeit des Kaninchens erwies sich demnach stark bakterizid gegenüber Anthracoides, schwach bakterizid gegenüber der Sarzine, und gar nicht bakterizid gegenüber dem Staphylococcus und Bac. mycoides roseus. Die Untersuchung der Bakterizidie des Blutserums in üblicher Weise ergab gleiche Resultate.

Hieraus ergibt sich, daß aus der Flüssigkeit der Bauchhöhle vor den anderen Saprophyten gerade die entschwanden, denen gegenüber diese Flüssigkeit bakterizide Eigenschaften entfaltet, d. h. Bac. anthracoides und die Sarzine, wobei dieser Prozeß dem Bakteriziditätsgrade parallel verläuft. Daher muß außer der Phagozytose auch die natürliche Bakterizidie der Flüssigkeit der Bauchhöhle eine wichtige Rolle bei der Vernichtung der in die Bauchhöhle eingeführten Saprophyten spielen. Daß bakterizide Stoffe im Blute und in den Säften des Organismus wirklich zirkulieren und nicht ein Produkt von Phagozytenzerfall in vitro sind, das läßt sich noch dadurch beweisen, daß in unseren Versuchen sowohl die Flüssigkeit der Bauchhöhle eines Kaninchens, die fast gar keine Leukozyten von phagozytärem Typus enthielt, als auch Blut, das zahlreiche Phagozyten aufwies, sich gleich bakterizid gegenüber gegebenen Mikroben verhält. Wenn wir die Bauchhöhlenflüssigkeit eines Kaninchens mittels Ausstrichfärbung mit Methylenblau untersuchen, so können wir nur selten, indem wir einige Gesichtsfelder durchsuchen, 1—2 kleine Lymphozyten — Zellen von nichtphagozytärem Typus — konstatieren. Sich von der Bakterizidie der Bauchhöhlenflüssigkeit überzeugen kann man noch folgendermaßen: In die Bauchhöhle werden 3 ccm suspendierter Sarzinen injiziert, jede 15 Min. wird ein wenig Flüssigkeit mittels einer sterilen Pipette entnommen und der Ausstrich mit Methylenblau gefärbt. Wir kommen leicht zu der Ueberzeugung, daß die Phagozyten erst nach $2^1/_2$—3 Std. in die Bauchhöhle einzudringen beginnen, und doch lassen sich schon nach 15—30 Min. selten ganze Sarzinen erkennen; zunächst sind sie dann bereits in einzelne Kokken zerfallen, die in kleinen Haufen umherliegen, bald in der Gestalt von Tetrakokken, bald ganz bunt durcheinander. Ein Teil von ihnen färbt sich schwach mit Methylenblau. In betreff des Bac. anthracoides aber ist folgendes festzustellen: Entnehmen wir 30 Min. nach Injektion der Suspension einen Tropfen Flüssigkeit der Bauchhöhle, so überzeugen wir uns, daß die Stäbchen eine scharfe degenerative Veränderung erlitten haben; zumeist sind nur Bruchstücke unregelmäßiger Form zu sehen, die sich schwach mit Methylenblau färben lassen. Bac. anthracoides schwindet aus der Bauchhöhlenflüssigkeit vor dem Auftreten der ersten Phagozyten in ihr.

Nachdem wir festgestellt hatten, daß die Bauchhöhlenflüssigkeit keine Bakterizidie gegenüber Staphylokokken besitzt, beschlossen wir, zu ermitteln, ob sie nicht nach Injektion besagter Mikroben in die Bauchhöhle bakterizid wird, da Beobachtungen uns lehren, daß der

Staphylococcus noch vor dem Auftreten der ersten Phagozyten in der Bauchhöhle seine charakteristische Lagerung einbüßt, und daß in der entnommenen Bauchhöhlenflüssigkeit einzelne, seltener 2—3 Kokken beisammen zu sehen sind. Außerdem läßt sich ein Teil der Kokken schlecht färben. Dasselbe ist auch von Bac. mycoides roseus zu sagen, der in der Bauchhöhlenflüssigkeit ebenfalls degenerative Veränderungen erleidet, die vor dem Auftreten der Phagozyten in derselben konstatiert werden können. Zu diesem Zwecke verfuhren wir folgendermaßen: In die Bauchhöhle des Kaninchens wurden je 3 ccm Suspension eines jeden von unseren Saprophyten eingeführt; nach $1^1/_2$—2 Std., d. h. noch vor dem Auftauchen der Phagozyten, wurde mit einer sterilen Pipette ein gewisses Quantum der Bauchhöhlenflüssigkeit entnommen und auf ein steriles Uhrglas ausgeblasen. Mit einer Schreibfeder zogen wir an der Pipette eine Linie, saugten die Flüssigkeit bis zu dieser Linie auf, bliesen sie auf flachen Agar, strichen sie aus und stellten sie in einen Thermostaten. Diese Schale diente zu Kontrollzwecken. Nachher wurde von dem Uhrglase wieder Flüssigkeit in die Pipette bis zu derselben Linie auf- und dann höhergesogen, die Pipette wurde am Ende verlötet und in den Thermostat auf 2—3 Std. gestellt. Wir gingen von der Voraussetzung aus, daß in dem Falle, wenn die Bauchhöhlenflüssigkeit unter der Einwirkung der eingeführten Suspension von Mikroben bakterizid geworden ist, letztere auch in vitro ihren Einfluß ausüben werden. Nach 3 Std. wurde die Pipette aus dem Thermostat herausgenommen, das verlötete Ende abgebrochen und der Inhalt auf eine Agarfläche hingeblasen. Nach 24 Std. wurden die gewachsenen Kolonien in der Versuchs- und in der Kontrollschale gezählt.

	Versuchsschale	Kontrollschale
Staphylococcus	800 Kol.	6000 Kol.
B. mycoides roseus	1000 „	5000 „

Die Versuchsergebnisse sprechen dafür, daß die Bauchhöhlenflüssigkeit gegenüber den Staphylokokken und Bac. mycoides roseus tatsächlich bakterizid geworden ist, und zwar schon $1^1/_2$—2 Std. nach der Injektion von entsprechenden Saprophyten in die Bauchhöhle, d. h. bevor die Phagozyten einzudringen begannen. Es ist zugleich wichtig, zu unterscheiden, ob wir es mit einer lokalen Erscheinung zu tun haben, oder ob auch das Blutserum bakterizid geworden ist. Daher wurde parallel zu dem zuvor angeführten Versuche dem Kaninchen aus einer Ohrvene Blut abgesogen und die Bakterizidie des Serums geprüft. Die Resultate waren negativ. Das zweite Mal wurde Blut 24 Std. nach der Einführung von Mikroben in die Bauchhöhle entnommen; nunmehr schien eine gewisse Bakterizidie des Serums vorhanden zu sein.

	Reines Serum	1:2	1:5	1:10	1:20
Staphylococcus	±	—	—	—	—
B. mycoides roseus	±	—	—	—	—

Nunmehr ist es klar, daß die Entstehungsquelle der bakteriziden Substanzen in den Elementen der Bauchhöhle selbst zu suchen ist. Diese Elemente sind am wahrscheinlichsten die die Bauchhöhle bekleidenden Zellen.

Ferner ist noch von Interesse, die Frage zu lösen, ob das Aufkommen von bakteriziden Stoffen in der Bauchhöhlenflüssigkeit dadurch veranlaßt werden kann, daß man in die Bauchhöhle reine physiologische Lösung einführt, oder mit anderen Worten, festzustellen, in-

wiefern die Mikrobenleiber bei diesem Phänomen mitwirken. Zu diesem Zwecke wurden in die Bauchhöhle 5 ccm steriler physiologischer Lösung eingeführt, nach 2 Std., d. h. vor dem Erscheinen von Phagozyten, entnahmen wir mit einer Pipette ein gewisses Quantum Flüssigkeit und stellten unter Anwendung der oben geschilderten Methodik einen Versuch über Bakterizidie an.

	Versuchsschale	Kontrollschale
Staphylococcus	20 000 Kol.	17 000 Kol.
B. mycoides roseus	7 000 „	8 000 „

Die Injektion von physiologischer Lösung in die Bauchhöhle machte die Bauchhöhlenflüssigkeit nicht bakterizid gegenüber den Saprophyten, für die sie normal unschädlich ist.

Die aus meinen Versuchsergebnissen zu ziehenden Schlußfolgerungen sind folgende:

Schlußfolgerungen.

1) Gegenüber verschiedenen Saprophyten besitzt die Bauchhöhlenflüssigkeit und desgleichen das Blutserum einen unterschiedlichen Bakterizidiegrad. Gegenüber Bac. anthracoides läßt sich starke Bakterizidie, gegenüber der Sarzine schwache, für den weißen Staphylococcus aber und für Bac. mycoides roseus ein gänzliches Ausbleiben derselben nachweisen. — 2) Diese Bakterizidie ist der Bauchhöhlenflüssigkeit und dem Blute des Kaninchens in normalem Zustande eigen und wird nicht nur in vitro als Resultat der Zerstörung von Phagozyten ausgelöst, da die Bauchhöhlenflüssigkeit des Kaninchens fast keine freien Zellen von phagozytärem Typus enthält; außerdem geht die Geschwindigkeit, mit der die besagten Saprophyten aus der Bauchhöhlenflüssigkeit verschwinden, dem Bakterizidiegrade gegenüber denselben parallel. — 3) Wird in die Bauchhöhle eines Kaninchens eine Suspension des weißen Staphylococcus und Bac. mycoides roseus injiziert, so gewinnt die Bauchhöhlenflüssigkeit, die in normalem Zustande kein Bakterizidievermögen gegenüber diesen Bakterien besitzt, ein solches schon nach $1^1/_2$—2 Std., d. h. noch vor dem Auftreten von Phagozyten in der Bauchhöhle. Folglich können diese bakteriziden Substanzen durchaus nicht als Produkte der Phagozyten angesehen werden; da ferner ihr Auftreten in der Bauchhöhlenflüssigkeit nicht von einem gleichzeitigen Auftreten im Blute begleitet wird, so sind sie als Produkte von lokalen Elementen, am wahrscheinlichsten von den die Bauchhöhle bekleidenden Zellen zu betrachten. — 4) Nach Injektion reiner physiologischer Lösung in die Bauchhöhle treten keine bakteriziden Substanzen auf.

Studien über den Mechanismus der natürlichen Immunität.

II. Mitteilung: Ueber den Prozeß der Phagozytose bei natürlicher Immunität.

[Aus dem bakteriologischen Laboratorium des Odessaer Medizinischen Instituts.]

Von Prof. **W. Jelin** (Odessa).

Mit 4 Abbildungen im Text.

In unserer ersten, dem Studium des Mechanismus der natürlichen Immunität gewidmeten Arbeit haben wir die wichtige Tatsache festgestellt, daß die gegen einige Mikroben, z. B. gegen einen Bac. mycoides roseus und einen Staphylokokkusstamm, ursprünglich nicht bakterizide Bauchhöhlenflüssigkeit $1^1/_2$—2 Std. nach erfolgter ip. Injektion dieser Mikroben, d. h. vor dem Auftreten von Phagozyten, bakterizid wird. Außerdem ist dargetan worden, daß die Mikroben auf die Bauchhöhlenflüssigkeit von vornherein bakterizid wirken, z. B. eine Sarzine und ein Bac. anthracoides-Stamm in ihr viel schneller umkommen als jene, für die sie nicht sogleich bakterizid ist. Es ist somit als wesentliches Moment der natürlichen Immunität des Organismus nicht allein die Phagozytosereaktion, sondern auch die bakteriziden Eigenschaften der Bauchhöhlenflüssigkeit selbst anzusehen. In vorliegender Arbeit soll gezeigt werden, wie der Prozeß der Phagozytose nach ip. Injektion beim Kaninchen mit unseren Saprophyten abläuft, und wo der Herd der bakteriziden Stoffe zu suchen ist, die in der Bauchhöhlenflüssigkeit zunächst fehlen und erst nach einiger Zeit auftreten. Zu diesem Zwecke wurde, genau wie in unseren vorigen Versuchen, einem Kaninchen ip. 3—4 ccm Suspension eines jeden von unseren Saprophyten injiziert. Indem wir jede 30 Min. mittels einer Pipette eine gewisse Menge Bauchhöhlenflüssigkeit entnahmen, ermittelten wir, daß der Andrang der Phagozyten nach 2—$2^1/_2$ Std. begann und gegen Ende von 24 Std. am stärksten war. Die Bauchhöhlenflüssigkeit wurde trübe, dann zäh, so daß sie nur mit Mühe in die Pipette aufgesogen werden konnte. In solchem Zustande verblieb die Flüsssigkeit gewöhnlich 8—10 Tage, nachher begann sie sich allmählich aufzuklären und wurde in der Regel am Ende der dritten Woche wieder klar. Als erste begannen die Mikrophagen herbeizuströmen, etwa 2 Std. später die Makrophagen, deren Zahl allmählich anwuchs. Das wurde ebenso in dem Falle beobachtet, wenn Bac. anthracoides injiziert wurde, das vor dem Auftreten der Phagozyten in der Bauchhöhlenflüssigkeit zugrunde ging, als auch dann, wenn man Staphylokokkus einführte. Ein Zuströmen der Phagozyten fand auch dann statt, wenn gewöhnlich übliche sterile physiologische Kochsalzlösung eingespritzt wurde, allerdings weniger energisch, die Phagozyten verschwanden in diesem Falle nach 3—9 Tagen aus der Bauchhöhlenflüssigkeit. Daneben wurde im Blute gleichzeitig Hyper-

leukozytose konstatiert: gegen Ende von 24 Std. befinden sich in 1 ccm Blut 16000—20000 Leukozyten.

Zur Beurteilung der phagozytären Reaktionsenergie wurde von der mittels einer Pipette gewonnenen Bauchhöhlenflüssigkeit ein Ausstrichpräparat hergestellt, das mit Loefflers Methylenblau gefärbt wurde. Die Zahl der an der Reaktion beteiligten Phagozyten diente zur Beurteilung der Reaktionsintensität. Es gelang mir fast nie oder nur sehr wenige Exemplare von phagozitierten Bac. mycoides ros. und Sarzinen zu sehen; hingegen wurde Staphylokokkus sehr energisch phagozytiert. Im Protoplasma polynukleärer Leukozyten konnte man etwa 4 Std. nach erfolgter Injektion eine bald größere, bald kleinere Anzahl teils gut, teils schwach gefärbter Kokken feststellen. Die Feststellung der phagozytären Tätigkeit der Mikrophagen kann uns jedoch keine genügende Erklärung der Tatsache geben, daß die Saprophyten aus der Bauchhöhle nicht weiter in die Gewebe und das Blut dringen, da die schnelle Vermehrung der Mikroben deren bekanntlich verhältnismäßig langsamen Untergang im Innern der Phagozyten in bedeutendem Maße kompensieren würden. Der von uns konstatierte Umstand, daß die Bauchhöhlenflüssigkeit, die vordem nicht bakterizid war, nach ip. Einführung einer Suspension von Mikroben bakterizide Eigenschaften an den Tag legt, ist imstande, das oben besagte Phänomen genügend zu erklären, er bezeugt aber zugleich die Mitwirkung des Bauchfellepithels an dem Schutzmechanismus des Körpers gegen die Saprophyten des Omentum, Mesenterium usw., da Bakterizidie vor dem Zuströmen der Phagozyten in der Bauchhöhle festgestellt wird. Es erscheint daher notwendig, die Mitwirkung an der Abwehr des Organismus der besagten Elemente zu untersuchen. Zu diesem Zwecke erhielt ein Kaninchen ip. 3—4 ccm Suspension eines jeden der von uns untersuchten Saprophyten eingeführt (die 24stünd. Agarkultur wurde mit 10 ccm phys. Lösung aufgeschwemmt). Nach einer bestimmten Zeit wurde das Kaninchen chloroformiert, die Bauchhöhle geöffnet und mit einer Lanzette ein Abschabsel des Bauchepithels entnommen, das auf dem Objektträger ausgestrichen, 20 Min. in 96proz. Alkohol fixiert, mit Loefflers Methylenblau gefärbt und auf den Inhalt von phagozytierten Mikroben untersucht wurde. Außerdem schnitten wir Stückchen der Bauchwand, des Omentums und Mesenteriums heraus, von denen Präparate hergestellt wurden, die zur Untersuchung des Umstandes dienten, ob die Saprophyten tatsächlich in die Gewebe dringen. Die Präparate wurden in folgender Weise bereitet:

Stückchen des herausgeschnittenen Gewebes wurden 24 Std. in absolutem Alkohol fixiert, in ein Gemisch von absolutem Alkohol mit Chloroform āā auf 3—4 Std. übertragen, von dort in reines Chloroform auf 12—15 Std., von dort in Chloroform mit leichtflüssigem Paraffin (46°) āā dann in reines leichtflüssiges, bis 46—48° erhitztes Paraffin auf $^1/_2$ Std., und schließlich in strengflüssiges, bis auf 58° erhitztes auf 20 Min.; Einbettung in strengflüssiges Paraffin; Herstellen mikroskopischer Schnitte; Fixierung des Präparats auf dem Deckgläschen; Trocknen; Aufhellen in Xylol; Abspülen mit Alkohol; Abspülen mit Wasser; Färben in Loefflers Methylenblau; Abspülen mit Wasser; Trocknen; Einschließen in Kanadabalsam. Die erhaltenen Schnittpräparate ermöglichten eine Untersuchung über die Beziehung der injizierten Mikroben zu den Geweben.

Versuch I. Einem Kaninchen sind 4 ccm Suspension Bac. mycoides ros. injiziert. Nach 4 Std. wird das Kaninchen chloroformiert, die Bauchhöhle geöffnet, ein Abschabsel des Bauchepithels gemacht, Stückchen der Bauchwand, des Omentums, des Mesenteriums werden

herausgeschnitten und Präparate dem Obigen gemäß hergestellt. Fig. 1 (Objektiv Reichert. homog. Imm. $^1/_{12}$ Okular IV) stellt zwei miteinander verbundene Zellen des flachen Bauchepithels dar; ihr Protoplasma ist ganz dicht mit Stäbchen gefüllt, deren Anzahl ungeheuer ist; gute Färbung.

Daneben sieht man auf der Figur 1 zwei andere Bauchepithelzellen. Die Stäbchenzahl in diesen ist gleichfalls sehr erheblich, sie färben sich aber schwach, sind in einen Haufen zusammengedrängt, und ihre Konturen treten nicht scharf hervor; hie und da sind frei im Protoplasma herumliegende Stäbchen wahrnehmbar, die sich ebenfalls schwach färben. Um die Zellen herum, teils an diese anliegend, ist eine Menge Stäbchen zu sehen, die ebenso wie die im Innern des Zellprotoplasmas liegenden blaß gefärbt sind. Hier haben wir ein anderes Phagozytosenstadium, in dem die aufgenommenen Mikroben unter der Einwirkung der Zellenverdauung schon degenerative Veränderungen erlitten haben. Ebenso verändern sich unter dem Einflusse der von Epithelzellen nach außen ausgeschiedenen Fermente auch die Stäbchen außerhalb der Zellen.

Die Untersuchung der Bauchwand-, Omentum-, Mesenteriumschnitte zeigt, daß in den tiefen Lagen der Gewebe unsere Stäbchen fast gar

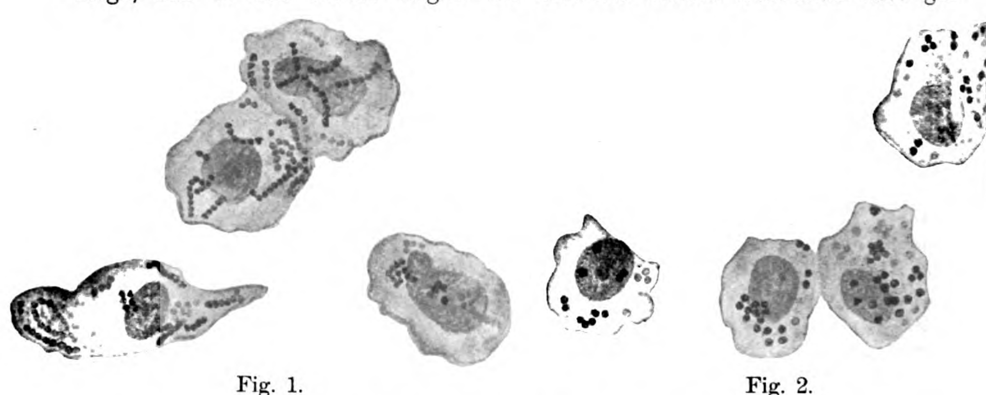


Fig. 1. Fig. 2.

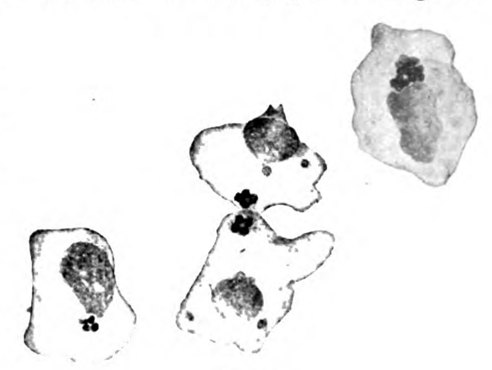
nicht anzutreffen sind. Bei sorgfältigstem Studium der Präparate kann man in diesen Organen nur ganz vereinzelte, von dem Endothel der lymphatischen und Blutgefäßchen aufgenommene Exemplare finden; zuweilen sieht man sie im Bindegewebe; offenbar werden sie hier durch irgendwelche, den phagozytären Elementen verwandten Zellen verschlungen. Das Bauchfellepithel entwickelt also eine ungeheure phagozytäre Tätigkeit. Die meisten der injizierten Stäbchen werden durch das Bauchfellepithel vor dem Auftreten der Mikrophagen in der Bauchhöhle aufgenommen, da diese erst nach 2—3 Std. herströmen, so daß ihnen nur die Abfälle der Beute anheimfallen. Die einzelnen Exemplare, denen es gelingt, sich durch den eisernen Ring der gierigen Bauchepithelzellen durchzuschlagen, werden von dem Endothel der lymphatischen- und Blutgefäße und ein Teil möglicherweise von den Phagozyten verwandten Zellen des Bindegewebes erbeutet.

Versuch II. Ein Kaninchen erhält ip. 4 ccm Suspension des weißen Staphylokokkus-Saprophyten. Nach 4 Std. wird das Kaninchen chloroformiert und die Bauchhöhle geöffnet. Mit einem Messer wird flaches Bauchfellepithel abgeschabt und ein Ausstrichpräparat herge-

stellt. Herausschneiden von Stückchen der Bauchwand, des Omentums, des Mesenteriums. Herstellen von Präparaten dem Obigen gemäß. Figur 2 (Objektiv Reichert. homog. Imm. $^1/_{12}$, Okular IV). Die Abbildung gibt eine Reihe von Zellen des Bauchepithels, in deren Inneren eine große Menge von Kokken zu sehen ist. Ein Teil dieser Kokken färbt sich gut, der andere schwach, und der dritte erscheint in der Gestalt von blassen Schatten. Wir haben folglich in ein und derselben Zelle unterschiedliche Degenerationsstadien, welche die Kokken unter dem Einflusse der Verdauung der Zellen erleiden.

Die Untersuchung der Bauchwand-, Omentum- und Mesenteriumschnitte zeigt, daß einzelne Kokken auch hier hinter die Epitheldecke in das Innere der Gewebe und in die lymphatischen Gefäße durchdringen, dort aber als Beute des Endothels der lymphatischen Gefäße und gewisser Bindegewebezellen, deren Wesen schwer zu ermitteln ist, umkommen.

Versuch III. Ein Kaninchen erhält ip. 4 ccm Suspension der Luftsarzine (die 24stünd. Kultur ist mit 10 ccm phys. Lösung ausgeschwemmt). Nach 2 Std. wird das Kaninchen chloroformiert, die Bauchhöhle geöffnet, ein Abschabsel des Bauchfellepithels gemacht, Stückchen der Bauchwand, des Omentums, des Mesenteriums werden herausgeschnitten. Präparate werden wie vorher hergestellt.


Fig. 3.

Die Fig. 3 stellt Gruppen von Zellen des flachen Bauchfellepithels dar; in den Gruppen sieht man keine ganzen Sarzinen, sondern einzelne Kokken, deren einer Teil für die Färbung schwach empfänglich ist.

Aus dem Studium der Bauchhöhlenwand-, Omentum-, Mesenteriumschnitte geht hervor, daß es einzelnen Kokken sehr selten gelingt, das Bauchfellepithel zu durchdringen, wo sie aber von dem Endothel der lymphatischen Gefäße aufgenommen werden, oder in dem Bindegewebe zugrunde gehen.

Versuch IV. Ein Kaninchen erhält ip. 4 ccm Suspension des Bac. anthracoides. (Die 24stünd. Kultur wurde mit 10 ccm phys. Lösung ausgeschwemmt.) Nach 1 Std. wird das Kaninchen chloroformiert, ein Abschabsel des Bauchfellepithels gemacht, Stückchen der Bauchwand des Omentums des Msenteriums werden herausgeschnitten. Präparate hergestellt.

Figur 4 gibt eine Gruppe von Zellen des Bauchfellepithels: in den Zellen sind blasse Bruchstücke von Stäben, die für die Färbung schwach empfänglich sind. Im Innern der Gewebe und in dem lymphatischen Endothel sind gar keine Stäbchen zu konstatieren[1]).

1) Es sei darauf hingewiesen, daß schon 1 Std. nach der Injektion einer Suspension von B. anthracoides in die Bauchhöhle im Bauchfellendothel Stäbchen nur mit großer Mühe sich auffinden lassen, und nach $1^1/_2$ Std. verschwinden diese gänzlich.

Jetzt können wir uns das Bild des Zugrundegehens der verschiedenen Saprophyten in der Bauchhöhle folgendermaßen vorstellen: Für den Kampf mit den Mikroben ist der immune Organismus mit verschiedenen Mitteln versehen. Für einige Mikroorganismen, wie z. B. Bac. anthracoides und Luftsarzine ist die Bauchhöhlenflüssigkeit des Kaninchens in normalem Zustande in größerem oder geringerem Grade bakterizid. Zugleich jedoch mit dieser Kraft entwickelt sich der Phagozytoseprozeß, wobei an erster Stelle die phagozytäre Tätigkeit des flachen Bauchfellepithels steht, und dann erst die der Mikrophagen. Und dennoch gelingt es einzelnen Exemplaren, die epitheliale Decke des Bauchfells zu durchdringen, um alsdann im Endothel der lymphatischen Gefäße und offenbar in den Bindegewebezellen, die den Phagozyten verwandt, umzukommen.



Fig. 4.

Das Gesagte ist in noch größerem Maße anwendbar auf die Saprophyten, hinsichtlich deren die Bauchhöhlenflüssigkeit in natürlichem Zustande gar keine Bakterizidität aufweist. Sie werden energisch von dem flachen Epithel des Bauchfells gefressen, sobald sie nur in die Bauchhöhle gelangen, so daß der Organismus nicht wehrlos bis zur Erscheinung der Phagozyten bleibt. Anderenfalls würden sie in den 2—3 Std., die vom Moment der Injektion bis zum Beginn des Zuströmens der Phagozyten verstreichen, sich mehrfach vermehren. Als Resultat der Aufnahme und des Verdauens der Mikroben erscheint das Ausscheiden verdauungsfördernder Fermente der Zelle in die Bauchhöhlenflüssigkeit, die dadurch Bakterizidie gegen die Mikroben erlangt und zum Untergang der nicht verschlungenen Mikroben beiträgt.

Was die Rolle der Phagozyten betrifft, so ist diese meiner Meinung nach eine mehr sekundäre. Sie kommen dem Bauchhöhlenepithel zu Hilfe, auf das der Hauptanteil an der Abwehr entfällt, und welches, um sich militärisch auszudrücken, sich dem ersten Stoß des Feindes entgegenstellt. Denn die Phagozyten beginnen erst nach einigen Stunden in die Bauchhöhle zu strömen, und in dieser Zeit würde der Organismus wehrlos bleiben, wenn nicht das Bauchfellepithel tätig wäre.

Schlußfolgerungen.

Der immune Organismus kämpft gegen die in die Bauchhöhle eingeführten Mikroben auf verschiedene Weise. Gegenüber den einen erweist sich die Bauchhöhlenflüssigkeit von vornherein in größerem oder geringerem Grade bakterizid, daneben tritt jedoch die mächtige phagozytäre Tätigkeit des Bauchfellepithels in den Vordergrund. Die in die Bauchhöhle erst später einströmenden Phagozyten spielen eine mehr sekundäre Rolle. Die phagozytäre Tätigkeit des Bauchfell-

epithels ist besonders da groß, wo die Bauchhöhlenflüssigkeit gegenüber gewissen Saprophyten keine ursprüngliche Bakterizidie an den Tag legt. Die Aufnahme und das Verdauen der Mikroben durch das Bauchfellepithel wird begleitet von einer Ausscheidung von verdauungsbefördernden Fermenten in die Bauchhöhlenflüsssigkeit, was die Tatsache erklärt, daß letztere bakterizide Eigenschaften gegenüber injizierten Mikroben gewinnt.

Nachdruck verboten.

Prüfung der bakteriziden Wirkung von Introzid, einer neuen therapeutisch wertvollen Jodcerverbindung, in Reagenzglasversuchen.

[Aus der Virusforschungsanstalt der Universität Jena (Leiter: Professor Dr. Pfeiler).]

Von **W. Pfeiler**, Jena.

Das Cer bzw. einzelne Verbindungen desselben sind bereits seit 80 Jahren in Verwendung. Systematische pharmakologische Untersuchungen fehlen aber noch. In manchen Ländern ist sein Gebrauch ein ziemlich ausgedehnter, in anderen, wie Deutschland, ist es nur wenig verwandt worden. Es ist in früheren Zeiten hauptsächlich gegen das Erbrechen der Schwangeren, ferner beim Erbrechen hysterischer Personen, bei Typhus und verschiedenen anderen Erkrankungen des Magen- und Darmkanals verordnet worden. Die anscheinend günstigen Wirkungen bei schwangeren Frauen haben dazu geführt, daß es auch bei verschiedenen Frauenkrankheiten, Menstruationsbeschwerden, Gebärmutter- und Adnexerkrankungen versucht worden ist, ferner bei Störungen im Bereiche des nervösen Systems, Epilepsie, Chorea usw.; auch bei gastrischen Krisen, Keuchhusten, Pneumonien und Phthise ist es als reizmilderndes und beruhigendes Mittel verabfolgt worden.

In einer Reihe von Veröffentlichungen habe ich auf die Wirkung einer neuen Jodcerverbindung, des Introzids, u. a. zur Behandlung der Sepsis hingewiesen. Bereits nach den Ergebnissen der ersten Versuche konnte kein Zweifel mehr bestehen, daß das Introzid berufen ist, vornehmlich bei septischen Erkrankungen den Gedanken der Therapia magna sterilisans wieder in den Vordergrund treten zu lassen. Die in der Praxis gemachten Erfahrungen bei Bauchfellentzündungen, eitrigen oder sonstigen Entzündungsprozessen von Schleimbeuteln, Gelenken, den verschiedensten fieberhaften Zuständen aus unbekannten Ursachen (1), Zellgewebsentzündungen, Influenza (der Pferde), Sepsis im Anschluß an schwere Darmentzündungen, auch vereinzelte Beobachtungen bei der perniziösen Anämie der Pferde (2), vor allem aber der Sepsis bei Menschen, Pferden und Rindern im Anschluß an Abort Puerperalfieber, bei Uterus- und Adnex-Erkrankungen (Erfurth 3, Pfeiler 4, 8, Goeters 18, Vogel 5), bei malignem Oedem (Schultheis 6, Pfeiler 11, Wüsthoff 7, Kuhn-Pomehrendorf), ja bei Rotlauf der Schweine (Otto 4, Droegenkamp, Lappe, Korreng, Köhler und vielen anderen) ließen den Gedanken naheliegend erscheinen, daß wir es bei der Wirkung des

Präparates evtl. mit einem besonderen Einfluß auf die Erreger der Sepsis schlechthin, aber auch auf solche spezifischer Septikämien zu tun haben.

Das Interesse, das der Verbindung zukommt, findet auch darin seine Begründung, daß Lewin (19) in Zusammenarbeit mit Auler, H. Hirschfeld, Zerner die Wirkung des Präparates auf bösartige Geschwülste, den Krebs des Menschen, vor allem aber auf die Lymphogranulomatose dargetan hat. Auch Blumenthal (9) hat der therapeutischen Wirkung des Jodarsens und Jodcers auf bösartige Geschwülste unlängst speziell Erwähnung getan. Eine besondere Beachtung verdienen diese Befunde, weil vor kurzem Vorlaender (10) über die außerordentliche Wirkung einer anderen Cerverbindung, nämlich des Cerchlorürs, das allerdings in Verbindung mit Trypanblau, Adrenalin, Cholin gegeben wurde, auf bösartige Geschwülste (Krebs) von Mäusen berichtet hat.

Es kann nicht Aufgabe einer Veröffentlichung an dieser Stelle sein, das heute schon überaus weitgehende klinische Material hier nur irgendwie zu schildern. Es ist auf die Ergebnisse nur teilweise und insoweit Bezug genommen worden, als dadurch gezeigt werden soll, welche Veranlassung zu der Veröffentlichung der folgenden Versuche vorgelegen hat, die den Zweck hatten darzutun, ob dem Introzid eine besondere Wirkung etwa auf bakterielle Krankheitserreger überhaupt oder auf einzelne im besonderen zukommt. Kurze Hinweise hierauf habe ich bereits an anderer Stelle gegeben (2).

Das von dem Chemiker Potratz konstituierte Introzid stellt nach Pfeiler (2) eine jodierte Verbindung des Cers (Ceriumjodür) dar. Das Cer gehört zu den sog. seltenen Erdmetallen. Sein Atomgewicht beträgt 140,25. Es wird heute allgemein als einheitliches Element angesehen und gilt im Gegensatz zu früher als drei- bzw. vierwertig. Die seltenen Erdmetalle nehmen eine Mittelstellung zwischen den Radioelementen und den übrigen Elementen ein, was wahrscheinlich mit die besondere Wirkung der Cerverbindung auf Krebs und bösartige Geschwülste in Analogie zum Radium und den Röntgenstrahlen erklärt.

Das Introzid stellt eine gelbbraune, alkalisch reagierende (mit dem Komparator nach L. Michaelis gemessen pH-Zahl 5,5 [p. nitrophenol]), gebrauchsfertige Flüssigkeit, die bei Luftabschluß unzersetzlich ist, dar. Es hat einen ziemlich charakteristischen, leichten Geruch nach Jod, einen eigentümlichen, leicht adstringierenden, nicht unangenehmen, süßlichen Geschmack und leicht kratzenden Nachgeschmack. Es ist eine in Kombination mit Neutralsalzen hergestellte, auf einen bestimmten osmotischen Druck eingestellte, wässerige Lösung von Jod und Cer, die sozusagen die Wirkung des Jodoforms im Körper in Lösung entfaltet und vielleicht auch deswegen stark antiparasitär, ferner heilend und granulationsanregend auf entzündetes oder sonstwie pathologisch verändertes Gewebe wirkt. Daher seine Verwendungsmöglichkeit auch bei den mannigfachsten inneren und chirurgischen Leiden (Herdreaktion).

Höheren Temperaturen gegenüber ist Introzid empfindlich; es darf nicht gekocht werden, weil sonst das in ihm enthaltene freie Jod zerstört wird und molekulare Umwandlungen der Struktur eintreten. Beim offenen Stehen in flachen Gefäßen oder flacher Schicht entweicht das freie Jod gleichfalls. Flaschen mit Introzid sind daher geschlossen zu halten; dann sind Veränderungen des Introzids ausgeschlossen. Sie sind im übrigen vom therapeutischen und selbst vom bakteriologischen Standpunkte aus nahezu belanglos, soweit sich das heute übersehen läßt. Auch entfärbte Introzidlösungen enthalten noch genügend direkt gebundenes Jod. Das Introzid kann als in sich steril bezeichnet werden. Verunreinigende Bakterien werden in ihm vernichtet. Selbst nach tagelangem, offenem Stehen in Verbindung mit hochwertigen Bakteriennährsubstraten wie Bouillon, Serum, Milch, Kasein usw. findet keine Bakterienentwicklung in ihm statt.

Mit destilliertem Wasser läßt es sich verdünnen. Flecken in Wäsche sind leicht zu beseitigen. Instrumente werden durch die Introzidlösung nicht angegriffen, wohl aber u. a. Platin.

Introzid schädigt in entsprechenden Mengen das gesunde Körpergewebe, insbesondere normale Zellen, nicht, auf kranke wirkt es regulierend im Sinne funktioneller und formativer Reize ein (vgl. die Lehren Virchows vom nutritiven usw. Reiz). Im Reagenzglase hat es stark koagulierende Wirkungen auf Eiweiß, nicht dagegen auf durch Schutzkolloide eingehüllte Eiweißsubstanzen. Hierauf dürfte es auch zurückzuführen sein, daß es das lebenswarme Blut nicht beeinflußt. Wird Blut mit der Spritze zu Introzid aspiriert, so daß bestimmte Blut-Introzidverdünnungen entstehen, so tritt keine Gerinnung ein. Das Blut bildet je nach der Konzentration eine mehr oder weniger flüssige Masse. Dadurch wird die weitgehende Anwendung des Introzids für intravenöse Injektionen möglich. Das so gewonnene Blutserum ist leicht durch Hämoglobin gefärbt[1]). Bei subkutaner und intramuskulärer Einspritzung in therapeutisch wirksamen, nicht zu großen Mengen entstehen keine Gewebsschädigungen. Mäuse von 15 g vertragen 1 ccm der gebrauchsfertigen Lösung subkutan, Meerschweinchen von 250 g dsgl., Kaninchen nach den Versuchen von Lewin (19) bei intravenöser Injektion 5—10 ccm, pro Woche 45 ccm. Das Introzid kann daher vom pharmakologischen Standpunkte aus als relativ oder nahezu ungiftig angesehen werden. Bei höheren Mengen als 1—2 ccm entstehen bei Meerschweinchen Abszesse bzw. Nekrosen.

Jodismuserscheinungen sind bisher nicht beobachtet worden. Im Harn der mit Introzid behandelten Kranken ist Jod selbst nach intravenöser Injektion von 5 ccm Introzid weder unmittelbar nach der Spritzung, noch in dem gesammelten Urin oder in den Einzelportionen des 24-Std.-Harns nachzuweisen gewesen. Auch an den folgenden Tagen findet es sich nicht im Harn. Danach muß geschlossen werden, daß das Jod des Introzids im Körper gespeichert bleibt und langsam und in kleineren Mengen, die sich dem gewöhnlichen Nachweis entziehen, ausgeschieden wird. Auch der Nachweis des Ceriums im Harn ist bisher nicht gelungen.

In den Organen von gesunden Versuchstieren (Kaninchen, mit größeren Mengen von Introzid behandelt) findet sich das Jod gespeichert, was die eigentümliche Wirkung des Introzids bei den verschiedensten Erkrankungen erklärt. Im Harn dieser Tiere war Jod unschwer nachzuweisen.

Im Kot ist das Cer nur in Spuren enthalten, in den Organen wird es in wechselnder Art gespeichert. Es scheint in einer uns noch unbekannten Weise in den Geweben gleichfalls gebunden zu werden, sich jedoch dem Nachweis oft zu entziehen. Im Urin der Versuchstiere ist Cer niemals zu finden gewesen.

Vorprüfende, bakteriologische Untersuchungen über das Jodcer hat Pfeiler (2) vorgenommen. Das Introcid hat ausgesprochen bakterizide und entwicklungshemmende Wirkungen. Es werden

Streptokokken	in	1	Std.	durch	eine	1,25proz.	Lösung
Staphylokokken	„	2	„	„	„	0,6	„	„
Rotlaufbazillen	„	1/2	„	„	„	1,25	„	„
„	„	2	„	„	„	0,025	„	„
Coli-Bazillen	„	6	„	„	„	0,125	„	„
Milzbrandbazillen u. Sporen	„	6	„	„	„	0,6	„	„
Paratyphus B-Bazillen	„	2	„	„	„	0,125	„	„
Typhusbazillen	„	2	„	„	„	0,6	„	„
Rinderabortusbazillen	„	1/2	„	„	„	0,25	„	„
Geflügelcholerabazillen	„	2	„	g	„	0,125	„	„

abgetötet.

Selbstverständlich gibt es Desinfektionsmittel, die dem Introzid überlegen, auch in der wirtschaftlichen Ausnutzung wesentlich billiger sind, so daß es für praktische Zwecke der groben Desinfektion nicht in Frage kommt. Die angeführten Ziffern zeigen jedoch, daß es bei längerem Verweilen im Tierkörper theoretisch infolge seiner außerordentlich geringen Giftigkeit die Erreger gefährlicher Infektionskrankheiten, vornehmlich der Septikämie, möglicherweise auch die der spezifischen Septikämien, abzutöten imstande sein kann. Jedenfalls geben diese bakteriziden Versuche bis zu einem gewissen Grade die Erklärung für die geradezu auffällige, in den meisten Fällen lebensrettende Wirkung bei Blutvergiftungen usw., wenn man nicht andere, mehr physikalisch-chemische Gesichtspunkte

1) Ueber weitere Einzelheiten der Beeinflussung des Blutes und Serums durch Introzid wird in einer besonderen Arbeit berichtet werden.

für diese Wirkung heranziehen will, wie sie neuerdings Pfeiler (11) entwickelt hat.

Bei den wenigen Versuchen, die bisher über die Wirkung von anderen, nicht jodhaltigen Cerverbindungen auf Bakterien ausgeführt worden sind, konnte eine Wirkung auf Luftkeime, Staphylokokken und Schimmelpilze ermittelt werden. So hat Ceronitrat nach Droßbach (12) in einer Lösung von 1:1000 jedes Wachstum der von ihm untersuchten Bakterien verhindert, Cerammoniumtartrat wirkt bei 1:200 entwicklungshemmend. Cerchlorid verhinderte in den Versuchen von Hara (13) schon bei einer Verdünnung von 1:150 das Wachstum von Typhusbazillen und Staphylokokken. Die Verdünnung von 1:400 zeigte nach 31 Std. noch spärliches Wachstum. Bei der gleichen Verdünnung reichten 5 Std. für die Entwicklungshemmung aus; bei 1:500 war nach 5 Std. nur eine geringe Wachstumshemmung festzustellen, 1:750 zeigte fast normales Wachstum. Bei Staphylokokken war bei der gleichen Verdünnung bei 2stünd. Einwirkung noch Wachstum nachweisbar. Hara hält im Durchschnitt eine Verdünnung von 1:200 für entwicklungshemmend.

Die Ergebnisse meiner eigenen, ziemlich ausgedehnten Versuche, aus denen weiter vorn nur ein kurzer Abschnitt angegeben worden ist, zeigen damit eine gute Uebereinstimmung, wenn man berücksichtigt, daß auch bei mir z. B. Typhusbazillen und Staphylokokken nach 2stünd. Einwirkung durch eine Verdünnung von ungefähr 1:200 abgetötet worden sind.

Bei meinen neuen Versuchen[1]) zur Prüfung der bakteriziden Wirkung des Introzids wurden als Ausgangsmaterial 24—48stünd. Bouillonkulturen verwendet. Seidenfäden (Stärke 3) von 1 bis 2 cm Länge wurden ca. 4 Std. in den einzelnen Kulturröhrchen zur Imprägnation belassen und dann in sterilen Petrischalen zur Trocknung in den Brutschrank gelegt.

Nach Trocknung der Fäden wurden sie, entsprechend der Absicht bei den einzelnen Versuchen, auf eine bestimmte Zeit in die gebrauchsfertigen (sog. konzentrierten), ferner in 50-, 25- usw. bis 1proz. Lösungen des Introzids gebracht. Es entsprechen in den Tabellen die Bezeichnungen:

konzentrierte Lösung	einer	2,5	proz.	Introzidkonzentration
50 Proz.	„	1,25	„	„
25 „	„	0,625	„	„
10 „	„	0,25	„	„
5 „	„	0,125	„	„
1 „	„	0,025	„	„

Die einzelnen Fäden wurden alsdann unter sterilen Kautelen in keimfreier physiologischer NaCl-Lösung gesondert gewaschen. Zur Kontrolle diente in den meisten Versuchen 3proz. Kresolseifenlösung, in die die jeweils für den Hauptversuch benutzten, mit der entsprechenden Bakterienart imprägnierten Fäden für bestimmte Zeit, die in den einzelnen Versuchen gelegentlich wechselte (s. Tabellen), gebracht worden waren, um nach Waschung ebenso wie die Fäden in den Hauptversuchen in keimfreie Bouillon zum Zweck der Prüfung der Abtötung der Versuchsbakterien gebracht zu werden. Die Bouillonröhrchen waren mit Nährflüssigkeit in der Menge von je 2 ccm gefüllt. Als weitere Kontrolle wurde jeweils ein mit Bakterien imprägnierter, aber nicht in Jodcer- bezw. die Kontroll-Desinfektionsflüssigkeit getauchter Faden zur Feststellung des Wachstums überhaupt benutzt. In einzelnen Versuchen wurde statt Kresolseifenlösung ein anderes Desinfektionsmittel zur

1) Die Durchführung der Versuche bzw. ihre Wiederholungen haben in den Händen der Herren Assistenten Dr. Brunner, Dr. Blume sowie des Herrn Goeters gelegen.

Kontrolle verwandt. Die entsprechenden Vermerke finden sich an den betreffenden Stellen.

Die Ergebnisse der einzelnen Versuche sind hierunter tabellarisch zusammengestellt. Es ergaben sich unter den von mir geprüften Bakterienarten 3 Gruppen:

I. Bakterien abgetötet bei 1,25proz. Konzentration in 1 und 10 Min.

a) **Rotlauf**, 20. 8. 1924 in Bouillon nach Behandlung mit Jodcer gebracht.

22. 8.	1 Min.	10 Min.	1 Std.	2 Std.	6 Std.	12 Std.	Kontrolle	Kresolseifenlösung 3proz.	
								1 Min.	5 Min.
0,025 Proz.	+	+	(+)	—	—	—	+	—	—
0,125 „	+	+	—	—	—	—	.	.	.
0,25 „	+	(±)	—	—	—	—	.	.	.
0,625 „	(+)	—	—	—	—	—	.	.	.
1,25 „	—	—	—	—	—	—	.	.	.
2,5 „	—	—	—	—	—	—	.	.	.

Zeichenerklärung: + = Wachstum, (±) = ganz geringes Wachstum,
(+) = Wachstumshemmung, — = kein Wachstum.

Am ersten Tage war in sämtlichen Röhrchen mit Ausnahme der Rotlauf-Kontrolle ein Wachstum überhaupt ausgeblieben. Erst nach 48 Std. zeigte sich Wachstum in den in der Tabelle aufgeführten Röhrchen. Es wird demnach schon bei sehr geringfügigen Konzentrationen des Präparates, z. B. 0,25proz. in 10 Min. eine starke Beeinflussung, die sich in deutlicher Wachstumshemmung kennzeichnet, erreicht. Bei einer Wiederholung des Versuchs trat nach 10 Min. überhaupt kein Wachstum mehr auf. Hier hatten 0,625 Proz. schon nach 1 Min. zur Abtötung ausgereicht.

b) **Geflügelcholera**, 21. 8. 1924 in Bouillon nach Behandlung mit Jodcer gebracht.

22. 8.	1 Min.	10 Min.	1/2 Std.	2 Std.	6 Std.	12 Std.	Kontrolle	Kresolseifenlösung 3proz.	
								1 Min.	5 Min.
0,025 Proz.	+	+	+	+	—	—	+	—	—
0,125 „	+	+	+	—	—	—	.	.	.
0,25 „	+	+	—	—	—	—	.	.	.
0,625 „	+	—	—	—	—	—	.	.	.
1,25 „	—	—	—	—	—	—	.	.	.
2,5 „	—	—	—	—	—	—	.	.	.

1/4proz. Lösungen genügen, um bereits nach einer Zeit von 1/2 Std. eine Abtötung der allerdings auch gegen andere Desinfektionsmittel empfindlichen Geflügelcholera-Bazillen eintreten zu lassen.

c) **Proteus**, 21. 8. 1924 in Bouillon nach Behandlung mit Jodcer gebracht.

	1 Min.	10 Min.	1/2 Std.	2 Std.	5 Std.	10 Std.	Kontrolle
0,025 Proz.	+	+	+	+	+	—	+
0,125 „	+	+	+	+	—	—	.
0,25 „	+	+	+	—	—	—	.
0,625 „	+	—	—	—	—	—	.
1,25 „	—	—	—	—	—	—	.
2,5 „	—	—	—	—	—	—	.

Die Proteus-Bazillen verhalten sich gegenüber den Jodcerlösungen ähnlich empfindlich wie Rotlauf- und Geflügelcholera-Bazillen.

II. Bakterien abgetötet bei 2,5proz. Konzentration nach 1 oder erst 10 Min.

a) Rinderabortus, 21. 8. 1924 in Bouillon nach Behandlung mit Jodcer gebracht.

25. 8.	1 Min.	10 Min.	1/2 Std.	2 Std.	5 Std.	10 Std.	Kontrolle	Kresolseifenlösung 3proz.	
								1 Min.	5 Min.
0,025 Proz.	+	+	+	(+)	—	—	+	—	—
0,125 „	+	+	+	—	—	—	.	.	.
0,25 „	+	+	—	—	—	—	.	.	.
0,625 „	+	—	—	—	—	—	.	.	.
1,25 „	+	—	—	—	—	—	.	.	.
2,5 „	—	—	—	—	—	—	.	.	.

Bei dem relativ langsameren Wachstum der Rinderabortus-Bazillen war eine deutliche Entwicklung erst nach einigen Tagen festzustellen. Es ist also eine stärkere Wachstumshemmung vorhanden gewesen. Nach viertägiger Bebrütung zeigte sich aber, daß bei 1,25proz. Konzentration des Introzids während der Zeit von 1 Min. eine vollständige Abtötung noch nicht eingetreten war. 0,25proz. Lösungen vermochten erst in 1/2 Std. eine Sterilisation zu erzielen. Bei 5stünd. Einwirkung sind auch bei 0,025proz. Lösung alle Abortusbazillen abgetötet.

b) Ferkeltyphus, 22. 8. 1924 in Bouillon nach Behandlung mit Jodcer gebracht.

23. 8.	1 Min.	10 Min.	1/2 Std.	2 Std.	6 Std.	Kontrolle	Kresolseifenlösung 3proz.	
							1 Min.	5 Min.
0,025 Proz.	+	+	+	+	—	+	+	—
0,125 „	+	+	+	—	—	.	.	.
0,25 „	+	+	+	—	—	.	.	.
0,625 „	+	+	—	—	—	.	.	.
1,25 „	+	—	—	—	—	.	.	.
2,5 „	+	—	—	—	—	.	.	.

In der Typhus-Coli-Gruppe, soweit sie überprüft worden ist, scheinen die Ferkeltyphusbazillen (Glässer-, Voldagsen-Bazillen) die am stärksten beeinflußbaren zu sein. Sie werden zwar in 2,5proz. Lösung des Introzids während 1 Min. noch nicht abgetötet, wohl aber in 10 Min. von der 1,25proz. Lösung. Ihre Resistenz gegenüber dem Introzid auch in schwächeren Lösungen ist gering. Selbst 0,025proz. Lösungen vernichten sie in einer Zeit von 6 Std.

c) Paratyphus-B, 15. 8. 1924 in Bouillon nach Behandlung mit Jodcer gebracht.

16. 8.	1 Min.	10 Min.	1/2 Std.	2 Std.	6 Std.	12 Std.	Kontrolle	Kresolseifenlösung 3proz.	
								1 Min.	5 Min.
0,025 Proz.	+	+	+	(+)	+	—	+	+	—
0,125 „	+	+	+	—	—	—	.	.	.
0,25 „	+	+	+	—	—	—	.	.	.
0,625 „	+	+	—	—	—	—	.	.	.
1,25 „	+	+	—	—	—	—	.	.	.
2,5 „	+	—	—	—	—	—	.	.	.

Der benutzte Paratyphus B-Stamm hatte eine etwas größere Resistenz gegenüber Introzidlösusungen als Ferkeltyphusbazillen. Ersterer wurde z. B. bei 0,025proz. Konzentration des Jodcers und 6stünd. Einwirkung noch nicht abgetötet.

d) Typhusbazillen, am 15. 8. 1924 in Bouillon nach Behandlung mit Jodcer gebracht.

16. 8.	1 Min.	10 Min.	1/2 Std.	2 Std.	6 Std.	12 Std.	Kontrolle	Kresolseifenlösung 3proz.	
								1 Min.	5 Min.
0,025 Proz.	+	+	+	+	+	+	+	+	—
0,125 „	+	+	+	+	—	—	.	.	.
0,25 „	+	+	+	+	—	—	.	.	.
0,625 „	+	+	+	—	—	—	.	.	.
1,25 „	+	+	—	—	—	—	.	.	.
2,5 „	+	—	—	—	—	—	.	.	.

Noch resistenter als der Paratyphus B-Stamm gegenüber Introzid sind Typhusbazillen. Bei dem benutzten Stamm trat nach 12stünd. Einwirkung einer 0,025proz. Lösung noch keine Abtötung ein, dagegen vernichten relativ niedrige Konzentrationen, wie eine 0,625proz., die Bakterien bereits nach 2stünd. Einwirkung.

e) Coli-Bazillen, am 14. 8. 1924 in Bouillon nach Behandlung mit Jodcer gebracht.

15. 8.	1 Min.	5 Min.	10 Min.	1/2 Std.	2 Std.	6 Std.	12 Std.	Kontrolle	Kresolseifenlösung 3proz.	
									1 Min.	5 Min.
0,025 Proz.	+	+	+	+	+	+	—	+	—	—
0,125 „	+	+	+	+	+	—	—	.	.	.
0,25 „	+	+	+	+	+	—	—	.	.	.
0,625 „	+	+	+	+	+	—	—	.	.	.
1,25 „	+	+	+	—	—	—	—	.	.	.
2,5 „	+	+	+	—	—	—	—	.	.	.

Der untersuchte Coli-Stamm wird bei einer Einwirkung des Introzids in 2,5proz. Lösung während einer Zeit von 1,5 und 10 Min. nicht abgetötet. Er ist resistenter als Typhusbazillen.

f) Staphylococcus pyogenes aureus, am 11. 8. 1924 in Bouillon nach Behandlung mit Jodcer gebracht.

12. 8.	1 Min.	10 Min.	1/2 Std.	2 Std.	6 Std.	12 Std.	Kontrolle	Kresolseifenlösung 3proz.	
								1 Min.	5 Min.
0,025 Proz.	+	+	+	+	+	+	+	—	—
0,125 „	+	+	+	+	—	—	.	.	.
0,25 „	(+)	+	(+)	+	—	—	.	.	.
0,625 „	(+)	+	(+)	—	—	—	.	.	.
1,25 „	+	+	—	—	—	—	.	.	.
2,5 „	+	+	—	—	—	—	.	.	.

Der untersuchte Stamm zeigt ungefähr die gleiche Resistenz wie der Typhusstamm.

g) Hämolytische Streptokokken vom Menschen, am 24. 11. 1924 in Bouillon nach Behandlung mit Jodcer gebracht.

25. 11.	1 Min.	10 Min.	30 Min.	2 Std.	6 Std.	12 Std.	Kontrolle
0,025 Proz.	+	+	+	+	—	—	+
0,125 „	+	+	+	+	—	—	.
0,25 „	+	+	±	—	—	—	.
1,25 „	+	+	—	—	—	—	.
2,5 „	+	—	—	—	—	—	.

Der untersuchte Stamm zeigt ein Verhalten, das zwischen dem des Staphyloc. pyog. aur. und dem des Ferkeltyphus-Bazillus steht.

III. Bakterien abgetötet bei 2,5proz. Konzentration in 1 Stunde.

a) Milzbrand, am 14. 8. 1924 in Bouillon nach Behandlung mit Jodcer gebracht.

15. 8.	1 Min.	10 Min.	1 Std.	2 Std.	6 Std.	12 Std.	Kontrolle
0,025 Proz.	+	+	+	+	+	+	+
0,125 „	+	+	+	+	+	+	.
0,25 „	+	+	+	+	(+)	+	.
0,625 „	+	+	+	(+)	—	—	.
1.25 „	+	+	+	—	—	—	.
2,5 „	+	+	—	—	—	—	.

Der für die Versuche benutzte Stamm Nr. 7 war ein uralter, atypischer, sporenbildender Laboratoriumsstamm, so daß die mit ihm erzielten Ergebnisse nicht ohne weiteres auf andere Stämme zu übertragen sind. Spätere Versuche, die mit anderer Technik und unter vergleichsweiser Heranziehung eines anderen virulenten Stammes ausgeführt worden sind, lassen gewisse Unterschiede erkennen. Bei diesem Stamm jedenfalls war eine Abtötung durch 2,5proz. Lösung in einer Stunde zu erzielen.

b) Staphylokokken-Stamm 582, mit Neigung zur kurzen Fadenbildung, 17. 12. 1924 in Bouillon nach Behandlung mit Jodcer gebracht.

15. 8.	1 Min.	10 Min	30 Min.	2 Std.	6 Std.	12 Std.	Kontrolle	Bazillol 10 Min.		
								1 %	5 %	10%
0,025 Proz.	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
0,125 „	+	+	+	+	+	+	.	.	.	.
0,25 „	+	+	+	+	+	—	.	.	.	.
1,25 „	+	+	+	+	+	—	.	.	.	.
2,5 „	+	+	—	—	—	—	.	.	.	.

Der Stamm stellt eine Uebergangsform zwischen Strepto- und Staphylokokken dar, ist gram +, lange Jahre im Laboratorium gehalten. Mäuse-Pathogenität besitzt er nicht. Er hat eine größere Resistenz gegen Introzid gezeigt als der Milzbrandstamm Nr. 7.

Es dürfte lohnen, die Ergebnisse dieser Versuche —, die ohne ein weiteres Eingehen auf die klinische Verwendung des Introzids und die dabei erzielten Resultate kaum eine besondere Beachtung beanspruchen könnten, weil das Introzid, wie erwähnt, wegen seines

Preises als Desinfektionsmittel überhaupt nicht in Frage kommen kann — näher zu besprechen. Im Reagensglasversuch zeigt manches Desinfektionsmittel eine ausgesprochene bakterizide Wirkung. Die große Giftigkeit dieser Stoffe, die Unmöglichkeit, sie dem Körper subkutan, intramuskulär, intravenös oder sonstwie einzuverleiben, macht aber ihre Verwendung zum Zwecke der Therapia sterilisans unmöglich. Anders liegt es bei dem Introzid bezw. einer ganzen Anzahl anderer von mir im Laufe des letzten Jahres bearbeiteter Cerverbindungen[1]. Es sei auf das in der Einleitung Gesagte verwiesen. Das Präparat ist in solchen Mengen dem Körper einzuverleiben, daß sich theoretisch nach dem Ergebnis der vorstehend beschriebenen bakteriziden Versuche eine Sterilisation des Körpers ergeben muß (Speicherung des Jods im Körper, Bindung des Cers in den Organen). Wenn eine Maus von 15 g z. B. 1 ccm des Präparates verträgt, so erhält sie damit 0,025 g Introzid, d. h. eine Menge, die im Reagensglase in einer Zeit von 2 Std. Rotlaufbazillen mit Sicherheit abtötet. Es ist nur die Frage, ob eine solche Menge schon ausreicht zur Abtötung im Körper, ferner ob bei Versuchen mit z. B. in eiweißhaltigen Vehikeln suspendierten Rotlaufbazillen dieselben Ergebnisse erzielt werden. Es wird Aufgabe weiterer Prüfungen sein, dies festzustellen.

Würden die Probleme der Chemotherapia sterilisans so einfach liegen, wie dies in dem eben aufgeführten Beispiel der Fall war, so würde sicher auf diesem Gebiete heute ein ganz anderer Fortschritt erzielt worden sein, als es in der Tat der Fall ist. So sehen wir denn auch, soweit meine bisherigen, noch unabgeschlossenen Versuche ein Urteil zulassen, durchaus nicht bei mit Introzid in dieser oder anderen Mengen gespritzten Mäusen etwa die Rotlaufinfektion prophylaktisch verhütet oder geheilt. Auf der anderen Seite aber werden bei der praktischen Anwendung des Jodcers und anderer Cerkuppelungen (siehe Anm.) bei den verschiedensten Erkrankungen, u. a. auch beim Rotlauf der Schweine, unbestreitbare Heilerfolge gesehen, die immer wieder, wenn man in den Anschauungen von der spezifischen Beeinflussung von Krankheitserregern befangen ist, den Gedanken einer Beeinflussung, d. h. Abtötung der Erreger, im Körper wachrufen. Ganz besonders augenfällig wird dies bei septischen Metritiden und beim septischen Abort. Nach neueren Berechnungen an Material aus der Praxis, das nur zu einem Teil nach den Regeln der Chirurgie und Geburtshilfe behandelt worden ist, zum Teil aber nur mit Introzid, sind bei Kühen mit derartigen Erkrankungen rund 90 Proz., bei Stuten 81,8 Proz. gerettet worden. Stuten sind bekanntlich hoch empfindlich gegen septische Prozesse. Bei Frauen steht mir noch kein größeres kasuistisches Material zur Verfügung. Doch ist nach den bisherigen Berichten auch bei ihnen die Wirkung des Introzids in gleicher Weise zutage getreten wie bei den weiblichen Haustieren.

Zieht man Vergleiche mit anderen einschlägigen Präparaten, so ergeben sich besonders für einzelne Bakterienarten zugunsten des Introzids sehr bedeutende Unterschiede, auf der anderen Seite aber auch interessante Analogien bzw. Differenzen zuungunsten des Introzids. Sörrensen (14) hat in der unter meiner Leitung an-

1) Die Präparate können von der Virusforschungs-Anstalt, Jena, Dornburger Straße 25, für Versuchszwecke auch unentgeltlich bezogen werden.

gefertigten Dissertation über die Wirkung der Pregl-Lösung bei verschiedenen Krankheitserregern eine gute Wirkung auf Streptokokken, Rotlauf-, Rinderabortus- und Coli-Bazillen festgestellt. Nach den vorn beschriebenen Versuchen werden erstere und letztere aber durch Introzid viel weniger stark beeinflußt als z. B. Rotlauf- und Rinderabortusbazillen. Presojod-„stark“ (eine auf meine Veranlassung geschaffene konzentrierte Pregl-Lösung) beeinflußt sogar die Milzbrandbazillen in auffälligem Maße, so daß man beinahe an eine spezifische Wirkung denken könnte. Breitenstein (15), der auf meine Veranlassung das Yatren unter ungefähr der gleichen Versuchsanordnung geprüft hat wie Sörrensen die Pregl-Lösung, hat für das Yatren gegenüber Rotlaufbazillen erst bei 12stünd. Einwirkung einer 0,25proz. Lösung im Reagenzglase die Abtötung ermittelt. Eine 10fach schwächere Introzidlösung macht das gleiche schon nach einer Zeit von 10 Min. bzw. 1 Std. Die Proteus-Bazillen werden durch eine $^1/_2$proz. Yatrenlösung erst nach 6 Std. vernichtet, eine $^1/_4$proz. Introzidlösung tötete sie mit Sicherheit schon nach 2 Std. Wir sehen also vielfach stärkere Wirkungen. Goeters und ich (unveröffentlicht) haben für das gebrauchsfertige Cajosol (Kombination von Kalziumjodid, Kalziumjodat und Kalziumhypojodid) festgestellt, daß es z. B. Ferkeltyphusbazillen in 25proz. Konzentration erst in 6 Std. abtötet; nach 2 Std. ist noch volle Bakterienentwicklung vorhanden. Introzidlösung vernichtet Ferkeltyphusbazillen in 25proz. Konzentration (= 0,625 Proz. des gebrauchsfertigen Introzids) nach $^1/_2$ Std. mit Sicherheit.

Selbstverständlich lassen sich diese Werte nicht an sich vergleichen, da die Ausgangskonzentrationen der beiden letzten, zum Vergleich herangezogenen Präparate verschieden sind. Weit interessanter aber gestaltet sich das Verhältnis, wenn für den Vergleich eine Jodcer-Kalziumchloridverbindung benutzt wird. Letztere scheint auf die Vertreter der Typhus-Coli-Gruppe eine besonders stark in die Augen springende Wirkung auszuüben, so daß seine therapeutische Verwendung besonders bei diesen Erkrankungen naheliegt. Ferkeltyphusbazillen werden durch diese Cerverbindung in 0,025proz. Lösung bereits nach 2 Std., wahrscheinlich aber sogar nach 1 Std. oder in noch kürzerer Frist vernichtet, während die gewöhnliche Introzidlösung in gleicher Konzentration dies erst nach 6 Std. macht. Beim Typhus des Menschen treten diese Unterschiede noch klarer hervor: eine 0,25proz. Introzidlösung tötet sie nach 6 Std. ab, das Kalziumchloridpräparat bereits nach 30 Min. Coli-Bazillen werden durch Introzidlösung 0,625-proz. in 6 Std. (Fadenversuch) abgetötet, durch die Kalziumchloridlösung in gleicher Konzentration (der Jodcergehalt ist der gleiche!) bereits nach längstens 30 Min., vielleicht aber auch in kürzerer Zeit.

Diese Versuche zeigen, da auch eine Anzahl anderer von Potratz und mir konstituierter Cerverbindungen bzw. Kombinationen wesentliche Abweichungen in der Wirkung gegenüber den einzelnen Krankheitserregern ergeben hat, daß wir hier dem Ziel einer weiteren spezifischen Beeinflussung der Bakterien durch chemotherapeutische Präparate näher zu kommen scheinen, wenn nicht, was für die Erklärung der somatischen Wirkung gleichfalls naheliegt, die Zellen durch die einzelnen Verbindungen in besonderer Weise, event. zur Abstoßung von Schutz- und Heilstoffen im Sinne der Rezeptoren, befähigt werden. Denn auch diese Deutung könnte man den Wirkungen mit unterlegen, die ich neuerdings vom Standpunkt der

physikalisch-chemischen Biologie der Zellen gerade in bezug auf das Jodcer gegeben habe, beimessen (11); diese Frage soll aber mit Rücksicht auf den Charakter der für die Veröffentlichung dieser Arbeit dienenden Zeitschrift hier nicht näher erörtert werden. Es sei auf das Studium der Originalarbeit verwiesen.

Möglicherweise kommen die verschiedenen Wirkungen des Jodcers einerseits auf die pathogenen Mikroorganismen selbst im Sinne der Bakterizidie auch im Tierkörper, andererseits seine zellstimulierenden und mesenchymal-antigenreizend wirkenden Eigenschaften zur Entfaltung. Es lohnt, was die bakterizide Wirkung des Jodcers im Reagenzglase anlangt, nach dieser Seite einen weiteren Vergleich mit einem so vorzüglichen Desinfektionsmittel wie dem Tetralol in Türkischrotlösung zu ziehen. Benthack (16) hat unter meiner Anleitung dieses Präparat zum Gegenstand eingehender Studien gemacht. Ebenso liegt eine eingehende Dissertationsschrift von Dietrich (17) über dieses Präparat vor. Eine 5proz. 2-Tetralol-Türkischrotlösung entspricht einem reinen, 1,11proz. 2-Tetralolgehalt. Eine 1,25proz. Introzidlösung hat in unseren Versuchen nach 1 Std. Milzbrandbazillen und Sporen abgetötet, während die reine 1,11proz. Tetralollösung dies in 24 Std. in den Versuchen von Benthack (16) noch nicht vermocht hat. Gegenüber Ferkeltyphusbazillen sehen wir ungefähr die gleichstarke Desinfektionswirkung bei beiden Präparaten. Aehnlich verhält es sich mit den Rinderabortusbazillen. Rotlaufbazillen dagegen werden wieder durch Introzid in 1,25proz. Konzentration nach 1 Min. vernichtet, die 1,11proz. Tetralollösung vermag dies noch nicht nach 5 Min. Eine $^{1}/_{4}$proz. Lösung des letzteren Präparates tötet nach 6 Std. noch nicht ab, erst nach 9 Std. verursacht sie eine Entwicklungshemmung, die bei Introzid schon nach 1 Min. zu verzeichnen ist.

Diese Umstände in ihrer Gesamtheit dürften es erklären, daß wir bei der praktisch-klinischen Anwendung des Introzids der Sepsis, aber auch spezifischen Infektionserregern der verschiedensten Art gegenüber den Arzt oder Tierarzt bzw. Tierbesitzer oft in gleicher Weise verblüffende Heilergebnisse sehen. Diese treten besonders hervor, wenn die Behandlung im Anfangsstadium der Erkrankung einsetzt, sofort größere Dosen oder kleinere wiederholt gegeben werden.

Um die bedeutungsvollen Beziehungen, die zwischen der Anwendung des Introzids in der klinischen Praxis und den hier anläßlich der Schilderung bakterizider Reagenzglasversuche gemachten Ausführungen bestehen, durch Tatsachen zu belegen, sei es verstattet, einige gekürzte Behandlungsergebnisse mitzuteilen.

Puerperalfieber schwerster Art. Neben intravenöser Trypaflavin-Injektion mehrmals 2 ccm Introzid. Die nahezu moribunde Patientin wird gerettet. — Ein entzündlicher Adnextumor war innerhalb einer Woche verschwunden. — Tuberkulose. Es scheint, daß während der Behandlung eine Wendung zum besseren eingetreten ist. Die Geräusche sind geringer geworden, der Allgemeinzustand hat sich gebessert; Patient sieht frisch aus, Müdigkeit und Appetitlosigkeit haben nachgelassen. (Dr. G. in M.).

Bei zwei Fällen von Lymphangitis Beeinflussung innerhalb von 24 Std. — Bei Tabes scheinen auch diesmal die gastrischen Krisen milder und in größeren Zwischenräumen zu kommen als früher. (Dr. Sch. in C.).

Bei 2 Fällen von Blasentuberkulose auffallend günstige Beeinflussung. (Dr. S. in J.).

Bei einem bisher als nahezu aussichtslos angesehenen Fall von Lymphogranulomatose ein überraschender. Erfolg. (Dr. B. in F.)

Operiertes Mamma-Karzinom einer 52jährigen Frau mit Metastasen in der Supraclaviculargrube. Seit 3 Monaten Tiefen-Röntgen-Bestrahlungen ohne Erfolg; die Metastasen wurden immer größer. 8 Introzid-Infusionen. Die Metastasen sind deutlich kleiner geworden. — 26jähriger Arbeiter mit faustgroßem Kropf, der seit einem halben Jahre besteht. 8 Introzid-Infusionen. Erfolg eklatant. (Dr. S. in L.).

Hartnäckiges Analgeschwür. Die Epithelialisierung machte schon am Tage nach der äußerlichen Anwendung starke Fortschritte. (Dr. L. in B.).

Inoperables Carcinom. Patientin fiebert noch. Zweimalige Injektion von Introzid. Entfieberung. Nach wochenlangem Fieber fühlt sich die Patientin äußerst wohl. (Dr. K. in G.).

Aehnlich lauten die Erfahrungen aus der Tierheilkunde, von denen aus Gründen der vergleichenden Therapie hier einige wiedergegeben seien:

Pferd mit Phlegmone hinten rechts, starker Verdickung und Lahmheit. 10 und am nächsten Tage 5 ccm Introzid intravenös. Nach 3 Tagen Schwellung und Lahmheit geschwunden. — Rehpinscher mit septischer Metritis. T. 40,7, P. nicht fühl- und zählbar. Ausfluß stinkend, schokoladenbraun. Magnozid-Spülung, Digalen, Introzid intramuskulär. Patient gesundet in 14 Tagen. (T. A. J. in L.).

Pinscher, schwer an Staupe erkrankt. Heilung wurde von Seiten des Tierarztes für ausgeschlossen gehalten, zur Tötung geraten. Auf Wunsch des Besitzers versuchsweise Behandlung. Introzid intramuskulär. Wider alles Erwarten Heilung. 17 andere Fälle mit gleichem Erfolg behandelt. (Dr. K. in B. S.).

Stute, Schwergeburt, Embryotomie. Entwickelung durch einen Laien während einer Zeit von 3 Std. nachts. 15 Carbo med.-Kapseln, wegen des Fiebers (39,5°) Introzid intravenös, Temperatur am nächsten Morgen normal. — Pferd zeigt plötzlich hohes Fieber (41,2°). Diagnose: Bronchitis. Introzid und Prießnitz. Am nächsten Morgen Patient fieberfrei. (Dr. E. in St.).

$2^1/_2$ Zentner schweres Schwein, Rotlauf. Serumbehandlung. In 6 Tagen 2 schwere Rezidive, T. 42, große Herzschwäche, moribund. Introzid. T. am nächsten Morgen 39,8°. Tier zum größten Staunen des Besitzers munter. (Dr. D. in B.).

Introzid zur Unterstützung bei der Heilimpfung mit Serum gegen Rotlauf; 4 Tiere im Bestande, eines erkrankt an septikämischem Rotlauf. Geheilt. — 10 Schweine, davon 2 je 25 kg schwer an septikämischem Rotlauf erkrankt. Geheilt. — 12 Schweine, davon 4 ca. 20—40 kg schwer an septikämischem Rotlauf erkrankt; alle 4 geheilt. (Dr. Z. in H.).

In letzter Zeit nach jeder Embryotomie Introzid gegeben. Selbst verzweifelte Fälle sind fast ohne jede Gesundheitsstörung verlaufen. U. a. viermal bei Embryotomie von Stuten verwandt, wo die Arbeit 1—$1^1/_2$ Std. gewährt hatte. In einem Falle bestimmt mit tödlichem Ausgang gerechnet. Auch da bei Anwendung von Introzid und Kohle keine Infektion. (Dr. T. in G.).

2 Fälle von schwerem Puerperalfieber bei Kühen. Beide Tiere genasen in 24—28 Std. nach intravenöser Injektion von Introzid. (Tierarzt M. in N.).

Kuh mit Metritis septica. Ablösung der Nachgeburt. T. 41,3°, P. 103. Freßlust sistiert. Carbo-Kapseln 5 Tage ohne jeglichen Erfolg. Am 6. Tage Notschlachtung ins Auge gefaßt; vorher Versuch mit Introzid, 10 ccm intravenös. Am folgenden Tage war das Tier gesund. T. 37,7°, P. 48. (Dr. M. in R.).

Eine Anzahl ähnlicher Fälle ist erst unlängst von Fraenzel (20), eine Kasuistik über 24 Fälle von Alias (21) veröffentlicht worden, die den hohen Wert der zellular- und chemotherapeutischen Behandlung mit Hilfe der Cerverbindungen dartun. Alias nennt die Wirkung souverän bei der Druse der Pferde, ebenso bei septischem Abort, Puerperalfieber und ähnlichen Erkrankungen.

Ich gebe nach Schilderung dieser kurzen klinischen Andeutungen der Hoffnung Ausdruck, daß der hier beschrittene Weg einer anscheinend chemotherapeutischen Beeinflussung von septischen und anderen Prozessen weitere Erfolge zeigen möge. Die von mir ausgeführten bakteriziden Reagenzglasversuche beanspruchen mit ihren Ergebnissen nicht, die bei der klinischen Anwendung des Cers gemachten Erfahrungen restlos zu klären. Sie sollen ein erster Anfang dazu sein zu zeigen, daß die Bakteriologie als Wissenschaft berufen ist, die großen Aufgaben,

die die Chemie im Dienste der sterilisierenden Therapie bei der Behandlung von bakteriellen Erkrankungen bisher nur in unbefriedigendem Maße zu lösen imstande war, mit klären zu helfen.

Zusammenfassung.

1) Die Jodcerverbindung Introzid zeigt in Reagenzglasversuchen außerordentlich starke bakterizide bzw. entwicklungshemmende Eigenschaften den verschiedensten Bakterienarten gegenüber, auch sporenbildenden. — 2) Die Konzentrationen, die dies im Reagenzglas bewirken, sind, in der vielfachen, oft hundertfach größeren Menge gegeben, für den Tierköper ungiftig. — 3) Die Möglichkeit einer inneren Desinfektion des Organismus durch Verbindungen vom Charakter des Jodcers wird dadurch erklärlich gemacht. — 4) Möglicherweise spielen bei der Auswirkung des Präparates im Sinne der Therapia magna sterilisans zellstimulierende und zellulartherapeutische Beeinflussungen von Zellkomplexen oder einzelnen Gewebsarten eine Rolle (Mesenchym, Drüsen mit innerer Sekretion). — 5) Die bei der klinischen Anwendung des Präparates, besonders bei der Blutvergiftung, aber auch Infektionskrankheiten gegenüber erzielten Erfolge lassen sich aus der Zusammenwirkung der bakteriziden Eigenschaften desselben und seiner zellstimulierenden bzw. zellulartherapeutischen Wirkungen erklären.

Literatur.

1) Pfeiler, W., Weiter auf dem Wege zur Therapia magna sterilisans. Klinische Versuche mit Introzid. (Tierärztl. Rundschau. Jhrg. 30. 1924. Nr. 38.) — 2) Ders., Bericht über Introzid, eine neue Cerjodverbindung, und mit ihr ausgeführte bakteriologische, biologische und klinische Versuche. (Ibid. Jhrg. 30. 1924. Nr. 50.) — 3) Erfurth, Anwendung von Introzid (jodierte Ceriumverbindung) in der Frauenheilkunde und bei septischen Erkrankungen. (Die Therap. d. Gegenwart. 1924. H. 12.) — 4) Pfeiler, W., Die Behandlung der Sepsis mit Introzid. (Münch. Tierärztl. Woch. Jhrg. 76. 1925. Nr. 4.) — 5) Vogel, Introzid bei puerperaler Septikämie. (Ibid. Jhrg. 76. 1925. Nr. 22.) — 6) Schultheis, Erfahrungen mit Introzid, Hämodiathesan und dem Mesenchymatren E 104 (Yatren-Vakzin.) (Tierärztl. Rundsch. Jhrg. 31. 1925. Nr. 24 u. 25.) — 7) Wüsthoff, Beiträge zur zellulartherapeutischen Behandlung mit dem Mesenchymatren E 104 (Yatren-Vakzin). (Berl. Tierärztl. Woch. 1925, im Erscheinen.) — 8) Pfeiler, W., Ueber eine der wesentlichsten Ursachen der Sterilität und ihre Verhütung. (Tierärztl. Rundsch. Jhrg. 31. 1925. Nr. 8.) — 9) Blumenthal, F., 25 Jahre Krebsbehandlung. (Med. Klin. Jhrg. 21. 1925. Nr. 15.) — 10) Vorländer, K., Heilungsversuche am experimentellen Krebs. (Klin. Woch. Jhrg. 4. 1925. Nr. 23.) — 11) Pfeiler, W., Chemo- bezw. zellulartherapeutische Beeinflussung von Anaëroben-Infektionen. Die Behandlung dreier Fälle von malignem Oedem mit E 104 und Introzid. Eine kurze Betrachtung des Problems von der Wirkung chemo- bzw. zellulartherapeutisch aktiver Substanzen. (Tierärztl. Rundsch. 1925. Nr. 35 u. 36.) — 12) Droßbach, Ueber den Einfluß der Elemente der Cer- und Zircon-Gruppe auf das Wachstum von Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Orig. Abt. I. Bd. 21. 1897. S. 57.) — 13) Hara, Beiträge zur Pharmakologie der seltenen Erdmetalle. (Arch. f. exp. Path. u. Pharmakol. Bd. 100. 1923. S. 217.) — 14) Sörrensen, G., Vergleichende Untersuchungen über die bakterizide Wirkung der normalen und der konzentrierten Pregl-Lösung. (Inaug.-Dissert.) Berlin 1923. — 15) Breitenstein, A., Untersuchungen über die bakterizide und wachstumshemmende Kraft des Yatrens. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 89. H. 7/8.) — 16) Benthak, H., Untersuchungen über die keimtötende Kraft von Tetralolpräparaten mit besonderer Berücksichtigung des 2-Tetralols. (Inaug.-Dissert.) Gießen 1922. — 17) Dietrich, Untersuchungen über die Desinfektionskraft einiger Tetralol-

derivate. (Inaug.-Dissert.) Berlin 1921. — 18) Goeters, W., Ein neuer Weg zur Behandlung d. sept. Aborts u. d. Puerperalfiebers, m. bes. Berücksicht. derart. Erkrankung. b. Stuten. (Ztschr. f. Gestütkd. 1925. Juli-H.) — 19) Lewin, C., Ueber die Verwendung einer Cerium-Jodverbindung (Introzid) in der Therapie der Geschwulstbildungen. Ein Beitrag zur Frage der Chemotherapie der Tumoren. (Med. Klin. 1924. Nr. 38.) — 20) Fraenzel, Ueber die Verwendung des Introzids in der tierärztlichen Praxis mit besonderer Berücksichtigung der Behandlung von zerebralen Störungen. (Berl. Tierärztl. Woch. Jhrg. 41. 1925. Nr. 32.) — 21) Alias, Erfolge und Mißerfolge mit Introzid. (Tierärztl. Rundsch. 1925. Nr. 32.)

Die Sichtbarmachung von Bakteriengeisseln am lebenden Objekt im Dunkelfeld.

[Aus dem Hygienischen Institut der Technischen Hochschule Dresden (Direktor: Professor Dr. Ph. Kuhn).]

Von Dr. med. vet. **Franz Neumann.**

Mit 6 Abbildnugen im Text und 4 Tafeln.

Es ist bekannt, daß man die Bakteriengeißeln nur durch besondere Färbungsmethoden sichtbar machen kann. Der erste, dem das gelang, war Loeffler. Die Methode, die die sichersten und schönsten Resultate liefert, ist die von Zettnow. Es erscheinen dann an dem Bazillenkörper feine, zarte, mehr oder weniger gewellte Fäden, die man als Bewegungsorgane — Geißeln — gedeutet hat. — Oft haben die Geißeln eine überraschende Aehnlichkeit mit Spirochäten. Da nun die Spirochäten trotz ihrer geringen Dicke und ihres geringen Lichtbrechungsvermögens mit leichter Mühe im Dunkelfeld sichtbar gemacht werden können, müßte man annehmen, daß auch die Bakteriengeißeln auf diese Weise sichtbar würden. Nimmt man aber irgendeinen beweglichen Bazillus, z. B. einen Coli-, Typhus- oder Paratyphusbazillus und untersucht ihn, wie üblich, in physiologischer Kochsalzlösung, so ist von Geißeln nicht die Spur zu erkennen.

Daher mag es wohl kommen, daß in der Literatur nur sehr wenig über die Sichtbarmachung von Bakteriengeißeln am lebenden Objekt zu finden ist und daß sich die Angaben zum Teil widersprechen. Die einzige größere Arbeit über die Sichtbarmachung von Bakteriengeißeln im Dunkelfeld ist die von Reichert (1) aus dem Jahre 1909. Die Arbeit beschäftigt sich zum größten Teil mit dem Spirillum volutans (s. giganteum), einem Organismus mit sehr starken Geißeln, die häufig schon in physiologischer Kochsalzlösung sichtbar werden. An den Bakterien hat er im allgemeinen die Geißeln nur dann gesehen, wenn sich mehrere zu einem starken Zopf verflochten hatten. Um auch die Einzelgeißeln sichtbar zu machen, empfiehlt er, die Bakterien in Lösungen bestimmter Salze, z. B. Natriumphosphat und in den verdünnten Beizen der bekannten Geißelfärbungsmethoden aufzuschwemmen. Abgesehen davon, daß hierdurch die Bakterien abgetötet werden und also auch in ihrer Bewegung nicht beobachtet werden können, tritt meistens auch noch eine so starke Ausfällung eiweißhaltiger Substanzen ein,

daß diese ausgefällten Teile durch ihre Aufhellung ein gutes Dunkelfeld, d. h. starke Kontrastwirkung illusorisch machen.

Nach vielen Versuchen ist es mir gelungen, nicht nur die dicken Geißeln bei den Spirillen und Selemonaden und die Geißelzöpfe bei den Bazillen, sondern auch die äußerst feinen seitenständigen Geißeln im Dunkelfeld sichtbar zu machen, so daß es möglich ist, einen näheren Einblick in die Bewegungsvorgänge der Bazillen zu tun.

Die Sichtbarmachung ist abhängig von der Beleuchtungsart, von der Art des Kondensors, von der Lichtquelle, von genauem Zentrieren des Kondensors und der Objektive, von der richtigen Spiegelstellung, vom Medium, in dem die Bakterien untersucht werden, vom Präparat und schließlich von der Kultur.

1. Die Beleuchtungsart: Im Hellfeld sind keine Bakteriengeißeln sichtbar, weil sie so dünn sind, daß sie selbst bei Zuhilfenahme stärkster Immersionssysteme jenseits der Auflösungsgrenze des Mikroskops bleiben. Im Dunkelfeld spielt das Auflösungsvermögen keine Rolle. Hier handelt es sich um das bekannte Tyndallsche Phänomen, daß feinste aufgewirbelte Stäubchen, die in einem hellen Zimmer nicht sichtbar sind, sofort sichtbar werden, wenn man das Zimmer verdunkelt und das Sonnenlicht nur durch einen schmalen Spalt hinein scheinen läßt. Wir können deshalb auch im Dunkelfeld schon ultramikroskopisch kleinste Teilchen sehen.

2. Der Kondensor. Im Paraboloidkondensor von Zeiß sind feinere Bakteriengeißeln noch nicht zu erkennen, sondern erst im Spiegelkondensor von Leitz.

3. Die Lichtquelle. Erforderlich ist eine Bogenlampe von 4 bis 6 Ampère; eine gewöhnliche Glühlampe hat nicht die erforderliche Lichtstärke. Gleichstrom ist dem Wechselstrom wegen des ruhigeren und helleren Brennens der Kohlenstifte vorzuziehen. Doch erhält man auch mit Wechselstrom schon gute Resultate. Die Sammellinse an der Bogenlampe ist so weit herauszuziehen, daß die Lichtstrahlen in einem möglichst kleinen Fleck zentral den Spiegel des Mikroskops treffen.

4. Das Zentrieren des Kondensors und der Objektive. Das Zentrieren des Kondensors erfolgt mit Hilfe der seitlich angebrachten Schrauben nach den auf der Oberfläche des Kondensors eingeritzten konzentrischen Kreisen. Zum Zentrieren der Objektive eignen sich am besten die Schlittenwechsler. Mangelhaft zentrierte Objektive geben entweder keine oder schlechte Dunkelfeldbilder.

5. Die Spiegelstellung. Die Spiegelstellung wird zunächst mit bloßem Auge ohne Objektiv und ohne Okular geprüft. Sie ist dann richtig, wenn im aufgelegten und mit dem Kondensor durch Zedernöl nur lose verbundenen Objektträger in der Mitte desselben konzentrische, gleichmäßig hellbeleuchtete Ringe erscheinen. Sind die Ringe nicht gleichmäßig hell beleuchtet, so dreht man den Spiegel so lange, bis die Ringe in allen Teilen gleichmäßig hell erscheinen. Nunmehr hebt man den Kondensor durch Drehen der Kondensorschraube so lange, bis der innerste hell beleuchtete Ring sich zu einem winzig kleinen Punkt zusammenzieht. Um den Punkt so scharf als möglich einzustellen, nehme man jetzt das kleinste Objektiv und das kleinste Okular. Je kleiner und heller der Lichtpunkt im Präparat wird, desto konzentrierter gelangt das Licht ins Präparat und desto größer wird die Kontrastwirkung.

Nachdem man so die richtige Spiegel- und Kondensorstellung hergestellt hat, kann man nunmehr für die eigentliche Beobachtung eine Oelimmersion einschalten, die der Apertur des Kondensors entsprechend abgeblendet sein muß. Ganz ausgezeichnet, wenn auch nicht die volle Apertur des neuen bizentrischen Dunkelfeldkondensors von Leitz ausnutzend, ist das Spezialobjekt für Dunkelfeld von Zeiß Nr. X, das man ohne Blende benutzen kann. Mit Komp.-Okular 12 gibt es eine 720fache Vergrößerung.

6. Das Medium, in dem die Bakterien untersucht werden, spielt eine Hauptrolle bei der Sichtbarmachung der Bakteriengeißeln, denn merkwürdigerweise sind die feineren Bakteriengeißeln niemals in destilliertem Wasser, in Leitungswasser, in physiologischer Kochsalzlösung, in Zuckerlösung oder in Brühe usw. zu erkennen, sondern immer nur in Flüssigkeiten, die kolloidale Stoffe gelöst enthalten, z. B. in Serum, Agarschwitzwasser und Gelatinelösung. Wahrscheinlich findet in diesen Medien eine Ansaugung gelöster Stoffe durch die Geißeln statt, so daß diese dicker werden und das Licht besser zurückwerfen. Jedenfalls ist die Sichtbarwerdung der Geißeln nicht nur darauf zurückzuführen, daß sich mehrere Einzelgeißeln zu einem Zopf verkleben, wie das Reichert (1) annimmt, denn auch die äußerst feinen Geißeln eingeißeliger Organismen, z. B. die des Vibrio Metschnikoff, die sich also gar nicht verzopfen können, werden in diesen Medien aber nie in anderen Lösungen sichtbar. Am besten hat sich mir eine 5—7proz. Nährgelatinelösung bewährt, die man bis zur absoluten Durchsichtigkeit filtriert hat. Da die Gelatine von Tag zu Tag wieder erstarrt, muß sie jedesmal durch Erwärmen über der Flamme flüssig gemacht werden.

7. Die Herstellung des Präparates. Objektträger und Deckgläschen müssen die für den Kondensor vorgeschriebene Dicke haben. Sehr praktisch ist die Dunkelfeldkammer von Leitz, weil sie von vornherein die richtigen Maße besitzt. Außerdem verhindert eine hohlgeschliffene Nut, in die die überflüssige Flüssigkeit vom Präparat abfließt, daß Strömungen im Präparat entstehen. Jedoch ist es schwierig, den Glaseinsatz der Kammer und das Deckgläschen so scharf aufeinanderzupressen, ohne daß der Einsatz, weil durch die eingeschliffene Nut geschwächt, zerbricht. Das scharfe Aufeinanderpressen ist aber nötig, um eine denkbar dünne Schicht zu erhalten. Je dünner die Schicht, desto besser gelingt die Sichtbarmachung der Geißeln. Diese dünne Schicht ist mit gewöhnlichen Objektträgern leichter zu erzielen, weil man auf diese das Deckgläschen mit Hilfe von Fließpapier schärfer anpressen kann. Es gelingt dann häufig, die Schicht an einzelnen Stellen so dünn zu machen, daß die Bazillen mit ihrem Körper zwischen Objektträger und Deckgläschen stecken bleiben und nun lebhaft, ohne fortzukommen, mit den Geißeln schlagen. Man kann auf diese Weise besonders die langen Individuen, die in schneller Fahrt ihre seitenständigen Geißeln meist dicht an den Körper geschmiegt halten und die deshalb schwer zu beobachten sind, zur vollen Entfaltung und Tätigkeit ihres ganzen Geißelbehanges zwingen. Das beigegebene Dunkelfeldphotogramm Tafel II, 15 ist auf diese Weise entstanden.

Um zu verhindern, daß vom Rande her die Flüssigkeit verdunstet und dadurch Strömungen im Präparat entstehen, muß man die Deckgläschen mit Vaseline umranden. Allerdings haben die gewöhnlichen Objektträger und Deckgläschen den großen Nachteil, daß sich zahl-

reiche allerfeinste Unreinlichkeiten im Glas befinden, die durch die eigentümliche Beleuchtungsart des Dunkelfeldes als winzig feine weiße Punkte in Erscheinung treten und den gewünschten tiefschwarzen Untergrund empfindlich stören. Oftmals geht auf diese Weise eine gute Kontrastwirkung völlig verloren.

Gleichfalls gestört wird die Kontrastwirkung, wenn man das Präparat zu dicht macht, d. h. mit zuviel Material beschickt, weil jedes beleuchtete Objekt seinerseits die Strahlen wieder zurückwirft und viele Objekte auf engem Raum somit das ganze Gesichtsfeld aufhellen. Im Anfang begnüge man sich deshalb mit wenig Material im Präparat, das in der Durchsicht makroskopisch kaum getrübt sein darf. Mit fortschreitender Uebung kann man dann immer mehr Material verwenden.

8. Die Kultur. Nicht alle Bakterienarten eignen sich gleich gut zur Sichtbarmachung der Geißeln. Auch innerhalb der einzelnen Stämme kommen Verschiedenheiten vor, so daß der eine Stamm die Geißeln gut, der andere sie weniger gut zeigt.

Die Geißeln der Spirillen und Selemonaden.

Am einfachsten sind die Geißeln bei den polar begeißelten Spirillen zu erkennen. Ebensogut sind sie bei den Selemonaden zu beobachten, bei denen die Geißeln in Gestalt eines stärkeren Bündels auf der Hohlseite des Körpers entspringen. Auch das Spirillum sputigenum besitzt gut sichtbare Geißeln, die genau wie die der Selemonaden inseriert sind. Aber während im gefärbten Präparat diese Organismen häufig statt einer oder zweier dicker Geißeln in vivo vielgespaltene Geißelbüschel aufweisen, zeigen sie im Dunkelfeld doch immer nur die Geißeln in einem dickeren Strang vereinigt.

Noch niemals ist es mir gelungen, beim Spirillum volutans, dessen Geißeln sich beim Färben in Büschel von besonders viel einzelnen Fäden auflösen (s. Tafel III, 21) im Dunkelfeld eine derartige Entfaltung zu beobachten. Der Zweifel Swellengrebels (2), ob in vivo die Geißeln wirklich aus vielen Einzelgeißeln bestehen, oder ob diese Aufspaltung im gefärbten Präparat eine Folge der Präparation sei, ist daher wohl berechtigt.

Die Geißeln der Typhus-Paratyphus-Colibazillen.

Ebenso ist bei den Geißeln der Typhus-Paratyphus-Coligruppe nur in seltenen Fällen mehr als eine — meistens stärkere — Geißel im Dunkelfeld zu erkennen, während im gefärbten Präparat die Zahl der Stäbchen, die mehrere Geißeln zeigen, häufig ist. Es ist nicht ausgeschlossen, daß sich mehrere Einzelgeißeln zu einer stärkeren Spirale verpflechten, ehe sie im Dunkelfeld erkennbar werden.

Wenigstens sieht man beim Typhusbazillus, weil er mehr Geißeln hat als der Colibazillus, fast regelmäßig an den einzelnen Stäbchen eine Geißel im Dunkelfeld, während bei dem weniger stark begeißelten Coli selten eine Geißel sichtbar wird.

Die Geißeln der eingeißeligen Bakterien und Vibrionen.

Fast niemals sind die Geißeln der eingeißeligen Bakterien und Vibronen im Dunkelfeld zu erkennen. Wahrscheinlich ist das Licht-

brechungsvermögen der einzelnen dünnen Geißeln so gering, daß sie vom Auge nicht wahrgenommen werden können. Nur in seltenen Ausnahmefällen sieht man in einer Kultur eingeißeliger Bakterien einmal ein Stäbchen mit einer Geißel, während abgeworfene Geißeln schon besser sichtbar werden, weil sie durch Aufquellung dicker geworden sind. Bei den Vibrionen habe ich die Geißeln nur an vereinzelten Individuen und an den großen Ballonformen wahrnehmen können.

Die Geißeln des Bacillus Proteus.

Am besten sind die Geißeln beim Bac. Proteus zu erkennen, und hier kann man auch bei entsprechenden Kulturbedingungen die Individuen erzielen, die uns die peritriche Begeißelung am schönsten offenbaren. Man nehme ein frisches Schrägagarröhrchen mit möglichst viel Agarschwitzwasser, beimpfe nur das obere Drittel des Agars und lasse das Röhrchen im Sommer bei Zimmertemperatur, im Winter auf dem Brutschrank 12—16 Std. stehen. Legt man also die Kultur am Abend an, dann ist sie am nächsten Morgen gebrauchsfähig. Der Proteus breitet sich dann während der Nacht über den ganzen Agar bis zu dem Schwitzwasser aus. Es ist erwünscht, daß er am nächsten Morgen das Schwitzwasser eben erreicht, nicht daß er es durch starke Vermehrung getrübt hat. Nimmt man dann eine halbe Normalöse des fast noch klaren Schwitzwassers auf eine Normalöse 5% flüssig gemachter Nährgelatine, so hat man gerade das richtige Verhältnis von Kultur und Untersuchungsflüssigkeit, bei dem die Geißeln am schönsten hervortreten. Ist der Proteus zu schnell gewachsen und hat sich das Schwitzwasser zu stark getrübt, so darf man natürlich nur Spuren einer Oese davon nehmen. Ist umgekehrt der Proteus zu langsam gewachsen und hat das Schwitzwasser nicht gereicht, dann muß man vom äußersten Rande der gewachsenen Kolonien abimpfen[1]).

Bei richtigem, also nicht zu starkem Wachstum im Schwitzwasser erhält man dann nach 12—16 Std. vorwiegend ganz große, 20—50 μ lange Fäden, die sich durch lebhafte Beweglichkeit und einen reichen seitenständigen Geißelbehang auszeichen. Bei keiner Bazillenart, außer den fusiformen Bazillen des Zahnbelags, habe ich mit solcher Sicherheit die seitenständigen Geißeln in vivo sichtbar machen können, als bei dem unter obigen Bedingungen kultivierten Proteus.

Je nach dem **Alter** der Bakterien werden nun die Geißeln verschieden gut sichtbar. An den eben entstandenen langen Fäden sind die Geißeln als äußerst feiner, im einzelnen kaum wahrnehmbarer, diffuser flimmernder Behang sichtbar, der in der Bewegung dicht an den Körper geschmiegt und durch die stark lichtbrechende Kante des Bazillenkörpers leicht überstrahlt wird. Ja, es kann vorkommen, daß an den jüngsten Individuen die Geißeln noch so wenig entwickelt sind, daß sie zunächst nicht im Dunkelfeld erkennbar sind und erst nach längerem Verweilen im Präparat hervortreten. Trifft man diese Entwicklung gerade im Schwitzwasser an, dann ist es vorteilhaft, noch 1—2 Std. zu

---

1) Man muß ausprobieren, wie schnell der Proteus wächst. Wächst er zu schnell, muß man eine größere Strecke des Agars bis zum Schwitzwasser unbeimpft lassen. Wächst er zu langsam, muß man die Strecke verkürzen.

warten und dann erneut ein Präparat anzufertigen. Man wird dann finden, daß die Geißeln nunmehr bei allen Individuen ausgezeichnet hervortreten.

Ob dieses Sichtbarwerden darauf beruht, daß die einzelnen Geißeln durch Wachstum stärker geworden sind oder darauf, daß sich mehrere der feinen unsichtbaren Einzelgeißeln zu einem, wenn auch kleinen Geißelzopf verflochten haben, diese Frage könnte erst beantwortet werden, wenn es gelänge, im Dunkelfeld auch die Einzelgeißeln mit Sicherheit sichtbar zu machen. Daß die Geißeln während der Beobachtung zusehends dicker werden und das Licht besser zurückwerfen, kann man bei den auf der Stelle geißelnden Proteus-Bakterien häufig beobachten. Auch das Sichtbarwerden der Geißeln der eingeißeligen Bakterien kann doch nur auf der Dickenzunahme ihrer einen Primärgeißel beruhen. Andererseits muß man mit der Möglichkeit rechnen, daß auch die zarten, im Dunkelfeld sichtbar werdenden Proteusgeißeln noch nicht die feinsten Primärgeißeln, sondern Geißeln 2. Grades, bzw. verflochtene Zöpfe sind, weil im gefärbten Präparat die Zahl der einzelnen Geißelfäden bei den langen Stäbchen immer noch beträchtlich größer ist, als die Anzahl der Geißeln, die im Dunkelfeld gezählt werden (vgl. Tafel I, 1 u. 2 mit Tafel II, 15)! Manchmal sieht man auch, wie die Geißeln eines auf der Stelle geißelnden Langstäbchens, die eben noch vorzüglich zu erkennen waren, unter dem Auge des Beschauers verschwinden. Man könnte denken, sie hätten sich unter der Einwirkung der Hitze aufgelöst. Aber dann tauchen sie plötzlich wieder auf und zeigen durch lebhaft rotierende Bewegung an, daß sie ganz intakt sind. Dieses Verschwinden würde sich vielleicht dadurch erklären lassen, daß sich die kleinen Geißelzöpfe zeitweise in ihre Primärgeißeln auflösen, die nun eben dem Auge im Dunkelfeld nicht mehr sichtbar sind.

Daß sich die Geißeln tatsächlich zu Zöpfen verflechten, wieder auflösen und wieder verflechten, kann man häufig an den dicken Endgeißeln, aber auch an den seitenständigen Geißeln erkennen. Das Dunkelfeldphotogramm (Tafel I, 15) bringt diese Verflechtung sehr gut zur Anschauung.

Die Verflechtung ist nichts Zufälliges, sondern sie unterliegt ebenso wie die Wiederauflösung der Tätigkeit des einzelnen Individuums. Immerhin wäre es auffallend, daß aus dem Gewirr unzähliger Geißelfäden (vgl. die nach Zettnow gefärbten Präparate (Tafel I, 1 u. 2) eines langen Proteus-Stäbchens durch gruppenweises Verflechten dieser Einzelfäden Figuren von solcher Regelmäßigkeit entstehen, daß auf jeder Seite des Bazillus immer gleichviel kleinste Geißelzöpfe dem Beobachter im Dunkelfeld sichtbar werden. Deshalb kommt vielleicht die Deutung der Wirklichkeit am nächsten, daß wir unter den vielen Geißeln eines Langstäbchens Geißeln **verschiedenen Alters** mit verschiedener Dicke und verschiedenem Lichtbrechungsvermögen finden, was im gefärbten Präparat deshalb nicht immer ganz klar zum Ausdruck kommt, weil die allerfeinsten Geißeln durch ihre Masse, die nur um ein weniges dickeren verdecken (s. Tafel I, 2). Im Dunkelfeld sind dann an solchen Stäbchen wahrscheinlich die allerfeinsten und jüngsten noch gar nicht sichtbar, sondern nur die etwas älteren und dickeren. Da diese gleichzeitig am ganzen Bazillus entstanden sind, erscheinen sie deshalb in so großer Regelmäßigkeit der Anordnung (s. Textfigur 3 und Tafel II, 15).

Je nach der Bewegungsart der Bazillen werden die Geißeln verschieden dicht am Bazillenkörper getragen.

Je schneller die Bewegungsart, um so dichter an den Körper an- gedrückt erscheinen sie (Textfigur 1). Die schnelle Bewegungsart is auch stets mit einer Rotation des Bazillus um seine Längsachse verbunden, so daß die Geißeln beständig um den Bazillenkörper wi die Flügel einer Windmühle kreisen. Besonders gut kann man die an den letzten über das Ende hinausragenden Geißeln erkennen, di in regelmäßiger Folge bald auf der rechten, bald auf der linken Seit des Bazillus erscheinen. Noch deutlicher wird die schraubige Drehun um die Längsachse sichtbar, wenn sich ein besonders langer Fade schleifenförmig umgebogen hat (Textfig. 2). Die Umbiegung zur Schleif ist immer die Einleitung zur Teilung. Verfolgt man eine solche Schleife so kann man sehr schön beobachten, wie die Trennung im Scheitelpunk der Schleife erfolgt und wie dann jede Hälfte selbständig weiter schwimmt.

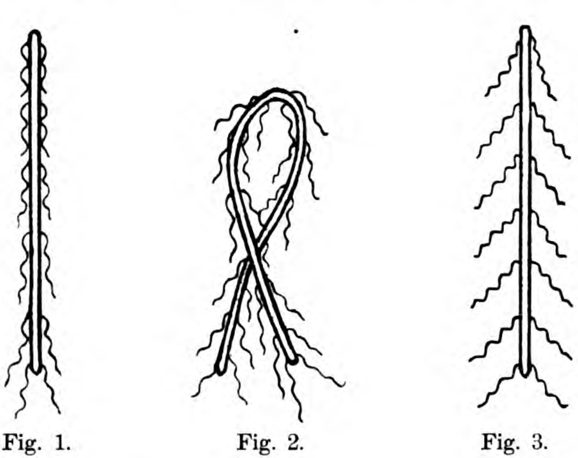


Fig. 1. Fig. 2. Fig. 3.

Bewegt sich der Bazillus nur in Gleitbewegung vorwärts ohne um seine Längsachse zu rotieren, eine Bewegungsart, die be den langen ungeteilten Fäden ziemlich selten ist, dann werden di Geißeln alle spitzwinklig zur Längsachse und unter sich genau paralle getragen (Textfig. 3) ein Bild von außerordentlicher Harmonie un Schönheit.

Hält der Bazillus plötzlich in der Bewegung inne, dann werde häufig die Geißeln alle wagerecht zur Längsachse abgespreizt, wobe die Form der Geißel wechselt, indem sie aus einer ganz steil gewickelten Spirale allmählich in eine solche mit flacheren Windunge übergeht und umgekehrt. Nimmt der Bazillus nunmehr wieder sein Vorwärtsbewegung auf, dann werden die Geißeln alle wieder durc die erzeugte Strömung nach rückwärts an den Leib gedrückt.

Entnimmt man Material von dem etwas älteren Agar belag, dann wird man finden, daß die Geißeln an de langen Stäbchen weniger dicht, daß sie dafür aber erheb lich dicker geworden sind. Vieles spricht dafür, daß sich di meisten Einzelgeißeln zu einigen wenigen dicken Hauptgeißeln ver

flochten haben. Diese Geißeln sind so dick, daß sie nunmehr schon im Paraboloidkondensor und manchmal in physiologischer Kochsalzlösung sichtbar werden. Wenn sie ganz dicht am Körper gehalten werden, sieht es aus, als hätte der Bazillus nur an jeder Seite eine ganz lange und dicke Geißel (Textfig. 4).

Untersucht man das Schwitzwasser am 2. Tage, wenn es stark getrübt ist, sieht man fast keine langen Fäden mehr, weil diese nun in viele einzelne Kurzstäbhen zerfallen sind. An diesen Kurzstäbchen sieht man in der Regel nur eine, und zwar recht dicke, Geißel, die nach ihrem Sitz am hinteren Ende (Textfig. 5) den Anschein erweckt, als wäre ein solches Stäbchen polar begeißelt. In Wirklichkeit ist es aber nicht eine Geißel, sondern es sind mehrere Geißeln, und sie entspringen nicht polar, sondern rings um den ganzen Körper des Stäbchens herum. Sie werden aber durch die rotierende Vorwärtsbewegung des Bazillus zu einem gemeinsamen Zopf zusammengeflochten. Manchmal ist der Zopf am basalen Teil noch nicht fest zusammengedreht, sondern gabelt sich in 2—3 Aeste. Man kann auch bisweilen beobachten, daß ein zusammengedrehter Zopf sich wieder in 2—3 Einzelgeißeln spaltet.

Untersucht man das Schwitzwasser am 3. Tage, so fallen besonders die **Kugelformen** des Proteus durch ihre reiche Begeißelung auf. Diese Kugeln entspringen häufig am Polende eines Stäbchens, man findet sie aber auch seitlich vom Bazillenkörper herauswachsen. Sie lösen sich, größer geworden, vom Bazillenkörper ab und bewegen sich selbständig, und zwar schraubig drehend, fort. Ihr Durchmesser ist etwa doppelt so groß als ein normales Stäbchen breit ist. Meist haben sie 2, manchmal auch noch mehr besonders dicke Geißelzöpfe (Textfig. 6). Die Zöpfe dieser Kugelformen sind ebenso wie die der älteren Stäbchen nicht immer untereinander gleich stark, wie man gut im Dunkelfeld erkennen kann. Im gefärbten Präparat kommt diese Unterscheidung weniger gut zum Ausdruck, weil die Geißelzöpfe häufig bei der Präparation verquellen [Fischer (3)]. Ebenso tritt im Dunkelfeld die ausgesprochene spiralige, korkzieherartige Form der Bakteriengeißel und die Regelmäßigkeit ihrer Windungen viel schärfer hervor, als im gefärbten Präparat, wo die Geißeln oftmals nur noch ganz flache Wellen zeigen.

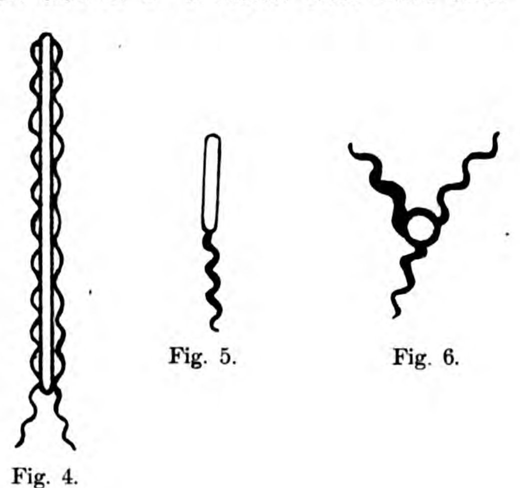


Fig. 4. Fig. 5. Fig. 6.

Die Bewegung, die die Geißeln ausführen, ist eine rotierende. Sie erfolgt meistens rechts-, seltener links herum. Am besten kann man diese Bewegung bei den älteren Stäbchen, die schöne, dicke Geißeln tragen, erkennen, namentlich wenn sie, ohne sich fortzubewegen, auf der Stelle mit den Geißeln rotieren. An diesen Stäbchen sieht man

auch, daß die Bazillen ihre Geißeln nach verschiedenen Richtungen stellen können, so daß dieselbe Geißel erst in Verlängerung der Längsachse, scheinbar polar angeheftet, dann aber senkrecht zu ihr auf der Seite erscheint. Hierbei kommt es vor, daß eine besonders lange Geißel sich halbkreisförmig krümmt, während sonst die Geißeln in der Längsrichtung ziemlich unverändert starr gehalten werden. Je nach dem Grade der Zusammenziehung verändert die Geißel die Form ihrer Windungen, so daß bei stärkster Zusammenziehung die Windung ganz steil, fast ziehharmonikaartig erscheinen. In der Ruhe kann man 2 Typen von Geißeln unterscheiden: einen steilgewickelten, man könnte sagen, Pallida-Typ, und einen flacheren der mehr an Recurrensspirochäten erinnert. Beide Typen kommen nebeneinander in derselben Kultur und an denselben Individuen vor, sind aber nicht konstant und wechseln oft. Die steilgewickelten findet man meist bei ganz jungen Stäbchen, die flacheren bei älteren.

Charakteristisch für die Bakteriengeißel ist ihre nadelscharfe Zuspitzung, die selten im gefärbten Präparat sichtbar wird. Auffallend ist nun, daß die Geißel, wenn sie abgeworfen wird, am basalen Teil nicht dicker, sondern ebenfalls zugespitzt ist.

Ebensowenig ist am basalen Teil der Geißel irgend etwas von einem lokomotorischen Kern zu sehen. Wohl aber kann man manchmal besonders in älteren Kulturen auf den Geißeln sowohl am freien Ende als auch an irgendeiner anderen Stelle der Geißeln kleinste, stark lichtbrechende Granula erkennen. Es dürften diese Granula identisch sein mit den in älteren Kulturen massenhaft auftretenden freischwebenden kleinen Körnchen, die aus irgendeinem Grunde an der schlüpfrigen Bakteriengeißel haften geblieben sind.

Charakteristisch ist ferner die Farbe der Geißeln im Dunkelfeld: sie erscheine bläulichweiß, wie die Spirochäten, während der Bakteriensaum stets rötlich schimmert.

Ueberhaupt weisen die abgeworfenen Geißeln eine solche verblüffende Aehnlichkeit mit Spirochäten auf, daß jeder, der zum 1. Male eine abgeworfene Geißel im Dunkelfeld sieht, diese für eine Spirochäte hält.

Das Abwerfen von Bakteriengeißeln

ist typisch für ältere Kulturen, wie jeder weiß, der einmal solche Kulturen auf Bakteriengeißeln gefärbt hat. Man findet sie dann zu Hunderten und Tausenden frei im Präparat herumliegen. Ich habe den Vorgang des Abwerfens mehrfach auch im Dunkelfeld beobachtet. Er erfolgt in verschiedener Weise:

1) Genau so wie bei den Flagellaten, d. h. die Geißel wird gewaltsam ausgestoßen und fortgeschleudert. Nur daß bei den Bakteriengeißeln wegen ihrer regelmäßigen Spiralform die Bewegung schraubig drehend erfolgt und länger anhält. Sieht man eine abgeworfene Bakteriengeißel in solchem Moment, so könnte man denken, eine eigenbewegliche Spirochäte vor sich zu haben. Eine Eigenbewegung wird auch häufig vorgetäuscht, wenn ein Bazillus an einer freiliegenden Geißel vorüberschwimmt und diese durch den Strudel in Rotation versetzt wird.

2) Häufiger aber werden die Bakteriengeißeln dadurch frei, daß sie mit zunehmendem Alter starrer werden und ihre Eigenbeweglichkeit

verlieren, während der Bazillus noch weiter rotiert und dadurch schließlich die Geißel vom Körper abschnürt. Hierbei wird die Geißel an der Abschnürungsstelle nach und nach immer dünner und immer länger, bis der Faden schließlich so dünn wird, daß er reißt.

Rießengeißelzöpfe.

Entgegen der Beobachtung von Zettnow (3) findet man auch beim Proteus solche Riesenzöpfe, wie sie Löffler zuerst beim Rauschbrand entdeckte. Die stärksten Zöpfe habe ich im Schwitzwasser 3—4 Tage alter Schrägagarkulturen gefunden. Sie lassen sich sehr leicht mit Cyanochintusche nach Eisenberg sichtbar machen, wobei die Windungen und bisweilen die Verflechtungen aus 2—3 Einzelsträngen außerordentlich plastisch zutage treten. Auf 1 Tropfen Tusche nimmt man 2—3 Normalösen des Schwitzwassers und läßt den Tropfen, ohne ihn auszustreichen, rasch über einen fettfrei gemachten Objektträger laufen. Man erhält dann in jedem Präparat mehrere solcher Zöpfe und läuft nicht Gefahr, daß die Zöpfe, wie bei der Geißelfärbungsmethode, durch die starke Verdünnung mit Wasser verquellen.

Da man die dicksten Zöpfe immer im Schwitzwasser, nicht auf dem Agar findet, so ist anzunehmen, daß es sich bei diesen Gebilden um Quellungserscheinungen handelt. Mit Sicherheit findet das Anwachsen bzw. Aufquellen solcher Zöpfe nicht am lebenden Bazillus, sondern erst nach dem Abwerfen statt. Und zwar sind es in der Hauptsache immer die Geißeln ein und desselben Bazillus, die sich verflechten, abgeworfen werden und dann aufquellen, wennschon auch eine Verflechtung von Geißeln verschiedener Bakterien zu beobachten ist. Aber diese Zopfbildung hält sich in beschränkten Grenzen und niemals erreichen solche Verflechtungen die Dicke eines Riesengeißelzopfes.

Zusammenfassung.

Die Sichtbarmachung der Bakteriengeißeln ist in erster Linie abhängig von dem Medium, in zweiter Linie von der Wahl des Kondensors. Als Medium hat sich eine 5proz. Nährgelatinelösung, als Kondensor der neue bizentrische Spiegelkondensor von Leitz bestens bewährt.

Die Geißeln der eingeißeligen Bakterien und Vibrionen sind im Dunkelfeld im allgemeinen **noch nicht** zu erkennen, ebenso sind auch die Geißeln der peritrich begeißelten Bakterien **im jüngsten Stadium** noch nicht sichtbar.

Mit dem Aelterwerden der Bakterien nimmt die Sichtbarkeit der Geißeln zu; sie treten in das **2. Stadium.** In diesem wird nunmehr an vereinzelten Stäbchen der eingeißeligen Bakterien und Vibrionen eine Geißel am Ende sichtbar. Bei den peritrich begeißelten Bakterien, besonders gut beim Bac. Proteus, treten jetzt an allen Längsstäbchen zu beiden Seiten des Körpers zahlreiche feine Geißeln in regelmäßigen Abständen auf. Ob

die Sichtbarkeit die Folge des Wachstums der Primärgeißeln, wie bei den Eingeißeligen oder nur die Folge der Verflechtung mehrerer Einzelgeißeln zu kleinen Zöpfen ist, läßt sich zurzeit noch nicht entscheiden.

Mit Sicherheit findet jedenfalls eine Zopfbildung durch Verflechtung mehrerer Geißeln ein und desselben Individuums statt und führt in das **3. Geißelstadium.** In diesem Stadium sind die Geißeln, weil erheblich stärker als im 1. und 2. Stadium, besonders gut im Dunkelfeld zu erkennen, und zwar bei den Langstäbchen, die auf der Stelle geißeln, vorwiegend an den Seiten, bei den schnell beweglichen Kurzstäbchen meist am rückwärtigen Pol.

Mit dem Aelterwerden der Kultur werden Einzelgeißeln und Geißelzöpfe nach und nach von den einzelnen Individuen abgeworfen. Im Schwitzwasser kommt es, wahrscheinlich durch Quellung, zur Bildung von Riesengeißelzöpfen. Erst nach dem Abwerfen nehmen die Geißelzöpfe die Dimensionen an, die wir bei den Riesengeißelzöpfen finden.

Wenn es auch nicht gelungen ist, die Geißeln der Bakterien in allen Stadien am lebenden Objekt sichtbar zu machen, so gewährt doch das Dunkelfeld die Möglichkeit, durch das Erkennen der Geißeln im 2. und 3. Stadium interessante Einblicke in die Bewegungsvorgänge der Bakterien zu tun.

Gleitbewegung und Schraubenbewegung der Bakterien sind jetzt mit Sicherheit zu unterscheiden.

Es ist zu hoffen, daß es bei Verwendung lichtstärkerer Dunkelfeldkondensoren mit entsprechenden Objektiven und bei Benützung eines Mediums, das die Eigenschaften der Gelatine, aber einen höheren Brechungsindex hat, gelingen wird, alle Bakteriengeißeln sichtbar zu machen.

Literaturverzeichnis.

1) Reichert, Ueber die Sichtbarmachung der Geißeln und die Geißelbewegung der Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 51. 1909.) — 2) Swellengrebel, Neuere Untersuchungen über die vergl. Zytologie der Spirillen und Spirochäten. (Ibid. Abt. I. Orig. Bd. 49. 1909.) — 3) Fischer, A., Untersuchungen über Bakterien. (Jahrb. f. wiss. Botan. Bd. 27. 1894. H. 1.) — 4) Zettnow, Ueber Geißelzöpfe. (Ztschr. f. Hyg. Bd. 58. 1909.)

Erklärung der Tafelabbildungen.

Tafel I.

Die Figuren 1—6 und 19—21 stammen aus Präparaten, die nach Zettnow gefärbt wurden.

7—13 wurde mit Cyanochintusche nach Eisenberg, 14 nach Tribondeau gefärbt. Die Figuren 15—18 sind im Dunkelfeld mit Hilfe des neuen Mikroskopaufsatzes der Ica, der sich für diese Zwecke vorzüglich bewährt hat, gemacht worden. Um die außerordentlich lichtschwachen einzelnen Geißeln genügend groß und scharf auf die Platte zu bringen, waren Zeitaufnahmen erforderlich. Zu diesem Zwecke wurden solche Bakterien ausgesucht, die sich nicht mehr bewegten. Fig. 1—6: Proteus-Bazillen in verschiedenen Stadien der Teilung und der Begeißelung. 500fach, Reinkultur aus dem Reichsgesundheitsamt, Stamm Galizien, gezüchtet auf 3proz. Schrägagar.

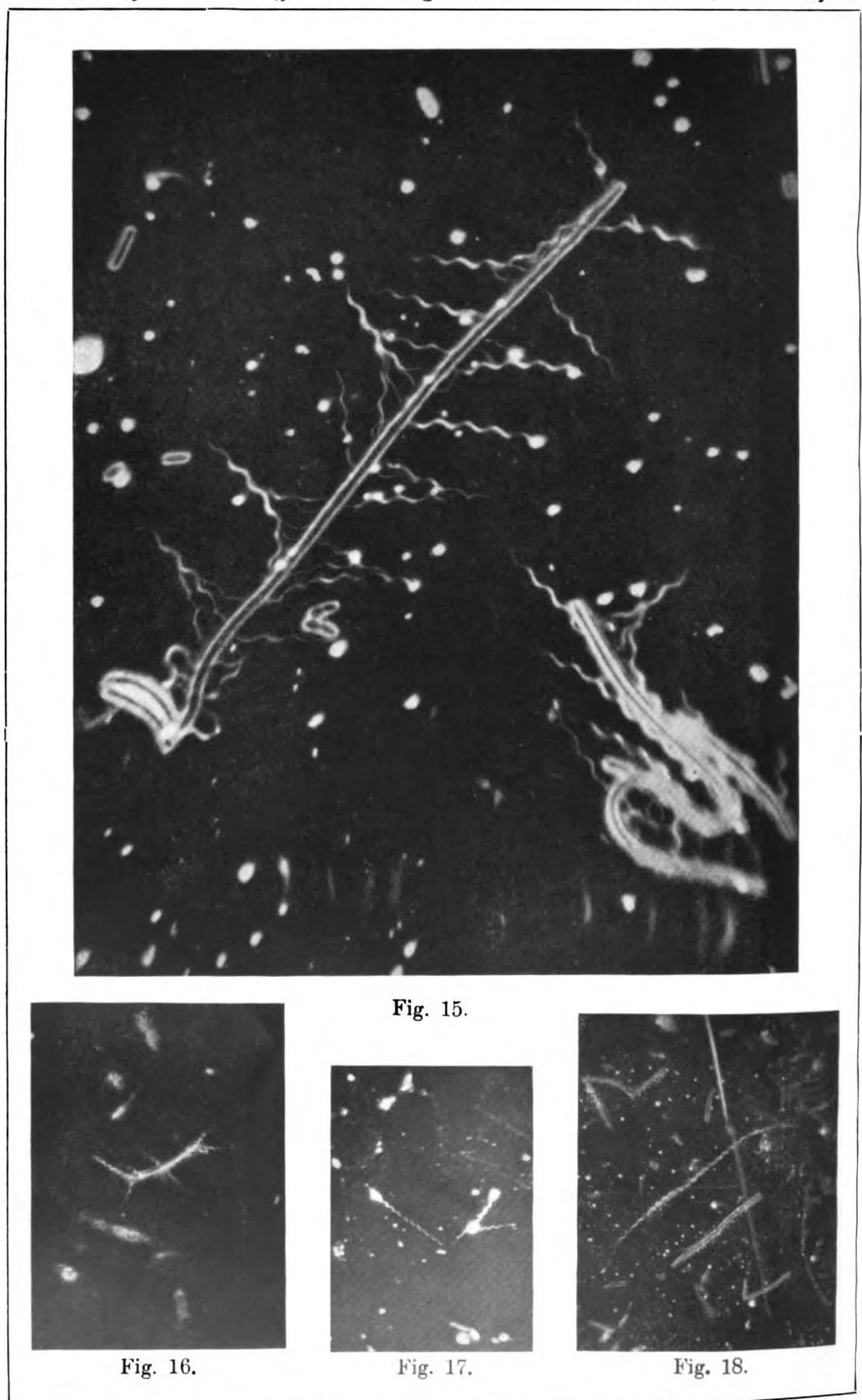


Fig. 15.

Fig. 16. Fig. 17. Fig. 18.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

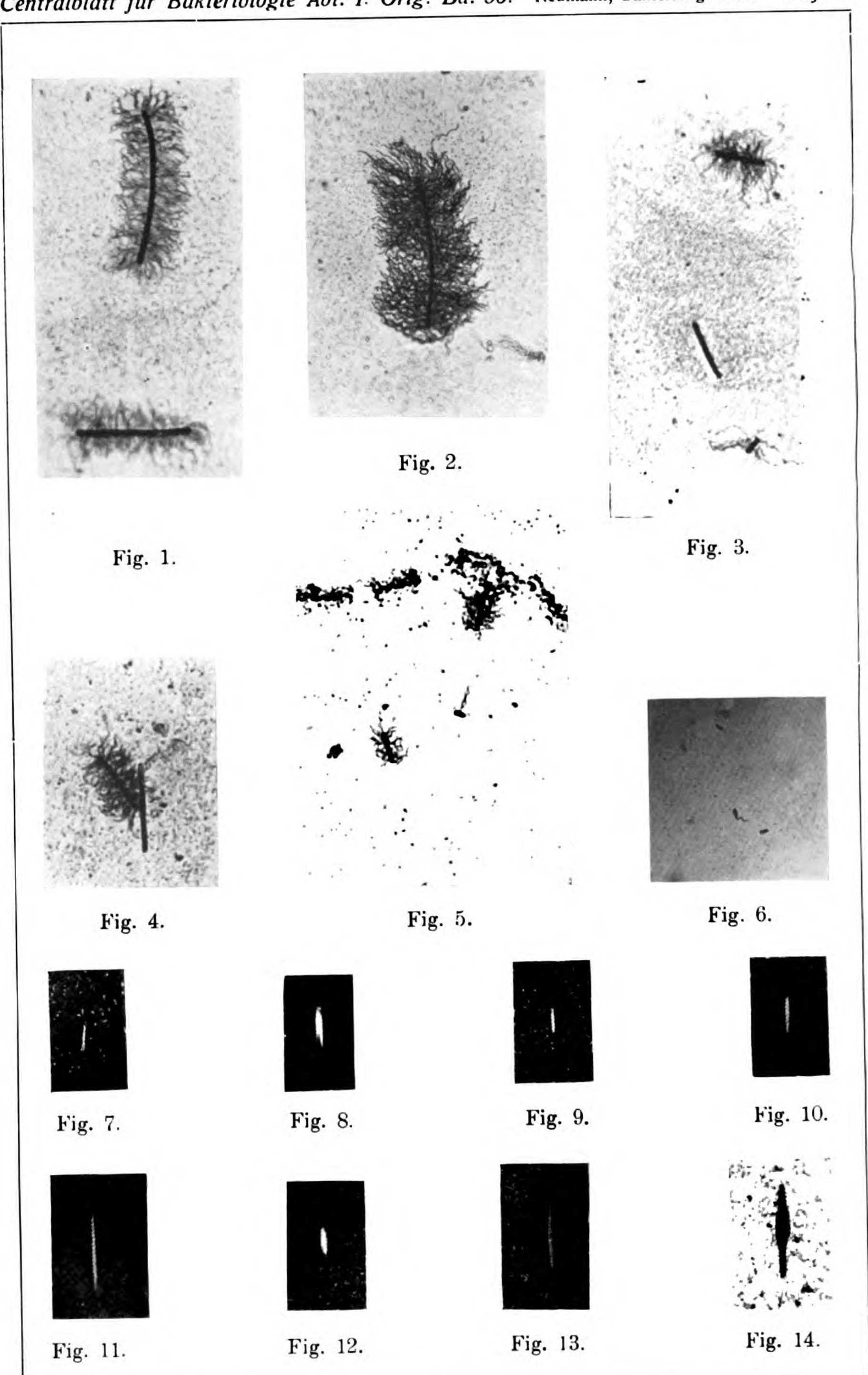


Fig. 1. Fig. 2. Fig. 3.

Fig. 4. Fig. 5. Fig. 6.

Fig. 7. Fig. 8. Fig. 9. Fig. 10.

Fig. 11. Fig. 12. Fig. 13. Fig. 14.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

Fig. 1 langes ungeteiltes Stäbchen mit außerordentlich zahlreichen, feinen dicht stehenden Geißelfäden: 1. Stadium der Begeißelung. In diesem Stadium sind die Geißeln im Dunkelfeld gar nicht oder nur als diffus flimmernder Behang erkennbar.

Fig. 2. In dem dichten Behang treten, bei schärferem Zusehen, einzelne stärkere Geißeln in ziemlich regelmäßigen Abständen hervor, die dann im Dunkelfeld zu erkennen sind: 2. Stadium der Begeißelung (vgl. Dunkelfeldbild 15).

Fig. 3 und 4. Kürzere Stäbchen mit und ohne Geißel. Es ist nicht anzunehmen, daß das Fehlen der Geißeln bei letzteren auf ein Mißglücken der Geißelfärbung zurückzuführen ist, weil die Geißelfärbung bei den anderen in nächster Nähe liegenden Bazillen geglückt ist. Auch würden sich, wenn die betr. Stäbchen wirklich begeißelt gewesen wären, die Reste der Geißeln in Gestalt eines schleimigen Hofes um den Bazillenkörper im Präparat gezeigt haben. Möglicherweise sind es Stäbchen, die ihren Geißelapparat noch nicht entwickelt haben.

Fig. 5. In der Mitte ein durch Teilung der oben gezeigten langen Formen entstandenes Kurzstäbchen mit nur 2 nicht zu einem Zopf verflochtenen Geißeln, die nach der Langseite herausgestreckt sind. Ein diffuser Behang ist hier nicht mehr vorhanden: 3. Stadium der Begeißelung.

Fig. 6a. Ovoides Kurzstäbchen mit nur einer, aber dickeren, scheinbar polar entspringenden Geißel, ebenfalls 3. Stadium. In diesem sind die Geißeln besonders gut zu erkennen. (Vgl. hierzu die 3 Kurzstäbchen in Fig. 18, die gleichfalls polare Begeißelung vortäuschen.)

Fig. 6b. Ovoides Kurzstäbchen ohne Geißel. Wahrscheinlich ist die Geißel abgeworfen, weil die Kultur 3 Tage alt war und in diesem Stadium sehr viele abgeworfene Geißeln im gefärbten Präparat und im Dunkelfeld zu finden sind.

Fig. 7—14. 250fach. Riesengeißelzöpfe des Bac. Proteus aus dem Schwitzwasser einer 4 Tage alten Schrägagarkultur. In Fig. 8 sieht man, daß das eine Ende des sonst ganz homogen erscheinenden Gebildes in zwei Spitzen ausläuft, was nur so zu erklären ist, daß der Zopf aus mindestens 2 Geißeln zusammengedreht ist. (Es wurden auch Geißelzöpfe gefunden, die in 3 Spitzen ausliefen.) Bei den anderen Geißelzöpfen fällt die leicht spindelförmige Gestalt, die Regelmäßigkeit der Windungen und die Zuspitzung an beiden Enden, also auch am basalen, auf.

Tafel II.

Fig. 15—18. Bac. Proteus, aufgeschwemmt in 7proz. Nährgelatine, Dunkelfeldaufnahmen. Durch die 7proz. Nährgelatine wird die störende Molekularbewegung fast vollständig aufgehoben und eine so ruhige Lage der Objekte gewährleistet, daß man Zeitaufnahmen machen kann.

Fig. 15. 2000fach. Langstäbchen mit zahlreichen seitenständigen Geißeln. Das Bild gibt mit außerordentlicher Deutlichkeit wieder, wie die Zopfbildung vor sich geht, indem mehrere Einzelgeißeln (des 2. Stadiums), die den etwas stärkeren in Bild 2 entsprechen dürften, sich, mit den freien Enden beginnend, zu einem stärkeren Zopf verflechten, der dann als Geißel des 3. Stadiums im Dunkelfeld sichtbar wird. Ob die ganz feinen Geißeln 1. Grades, wie in Fig. 2, außerdem noch an diesem Bazillus vorhanden sind, läßt das Dunkelfeld zurzeit noch nicht erkennen. Dagegen sieht man, daß die Teilungswände, ca. 30, schon alle, ziemlich gleichmäßig über die ganze Länge des Stäbchens verteilt, angelegt sind. Am linken unteren Ende sieht man außerdem auf jeder Seite je ein ringförmiges Gebilde. Diese Gebilde sind Kugeln, über deren Entstehen und Weiterwachsen an anderer Stelle ausführlich berichtet werden soll.

Fig. 16—18. 650fach. Fig. 2, Proteus-Stäbchen mit Geißeln 2. und 3. Grades. Die Konturen des Körpers sind unscharf, weil der Geißeln wegen zu lange belichtet wurde. Dasselbe gilt von

Fig. 17. 3 Proteus-Kurzstäbchen mit je 1 dicken Geißel 3. Grades, die scheinbar polar entspringt. (Vgl. hierzu das gefärbte Kurzstäbchen mit einer dicken Geißel in Fig. 6.)

Fig. 18. Abgeworfene Proteus-Geißeln 3. Grades von großer Länge, an Spirochäten erinnernd.

Tafel III.

Fig. 19. Bac. suipestifer-Reinkultur mit steil- und flachgewinkelten Geißeln 1000fach.

Fig. 20. Abgeworfene Geißeln aus demselben Präparat wie 19, Spirochäten des Pallida-Typs vortäuschend. 3000fach.

Fig. 21. Spirillum volutans, 14 Tage alte Reinkultur, mit polaren Geißelbüscheln, 1000fach.

Tafel IV.

Dunkelfeldaufnahmen von Bac. Proteus. Frische Schrägagarkultur, aufgeschwemmt in 5proz. Gelatine. Aufgenommen mit der Mikroskopaufsatzkamera Micca von Leitz. Bizentrischer Dunkelfeldkondensor und Fluorit-Immersion $^1/_7$ a ebenfalls von Leitz.

Fig. 22. Vergrößerung 1000fach. Ausschnitt aus Fig. 24 um das Doppelte vergrößert.

Fig. 23 u. 24. 500fach. In Fig. 23 ist deutlich an dem großen, S-förmig gekrümmten Stäbchen erkennbar, wie biegsam der Bazillenkörper sein kann. An seiner linken Seite hat sich ein anderes kürzeres Stäbchen, das aber ganz gerade ist, festgefahren. An ihm sind die Geißeln, weil noch in lebhafter Bewegung, nur als hellerer Schatten sichtbar, während sie an dem gekrümmten Stäbchen, das ruhig liegt, besonders gut zum Vorschein kommen.

Die Verwendbarkeit der Chinhydronelektrode zur Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration in den Nährböden.

[Aus dem Hygien. Institut der Universität Königsberg (Direktor: Prof. Dr. Selter).]

Von Dr. med. **Franz Schmidt**, Assistent des Instituts.

Mit 1 Abbildung im Text.

Die Wasserstoffionenkonzentrationsmessung (PH) hat in letzter Zeit immer mehr an Bedeutung gewonnen. Bald hat man auch die Wichtigkeit der H·-Ionenmessung für die Nährböden zur kulturellen Züchtung von Bakterien erkannt, da einige Bakterien, z. B. Pneumokokken und Gonokokken, nur bei einer genau bestimmten Wasserstoffionenkonzentration bzw. einem genau definierten Wasserstoffexponenten ein optimales Wachstum zeigen, während andere Bakterien eine mehr oder weniger große Variationsbreite der aktuellen Reaktion des Nährbodens zu ihrer Weiterentwicklung gestatten. Eine ganze Reihe von Methoden wurde ausgearbeitet, die im Laufe der Zeit zahlreiche Verbesserungen durchgemacht haben. Einmal wurden indirekte Methoden benutzt, so die Indikatoren von Sörensen, welche infolge der umständlichen Herstellung der Regulatorengemische nicht allgemeine Verbreitung erlangen konnten und bald durch die Michaelisschen

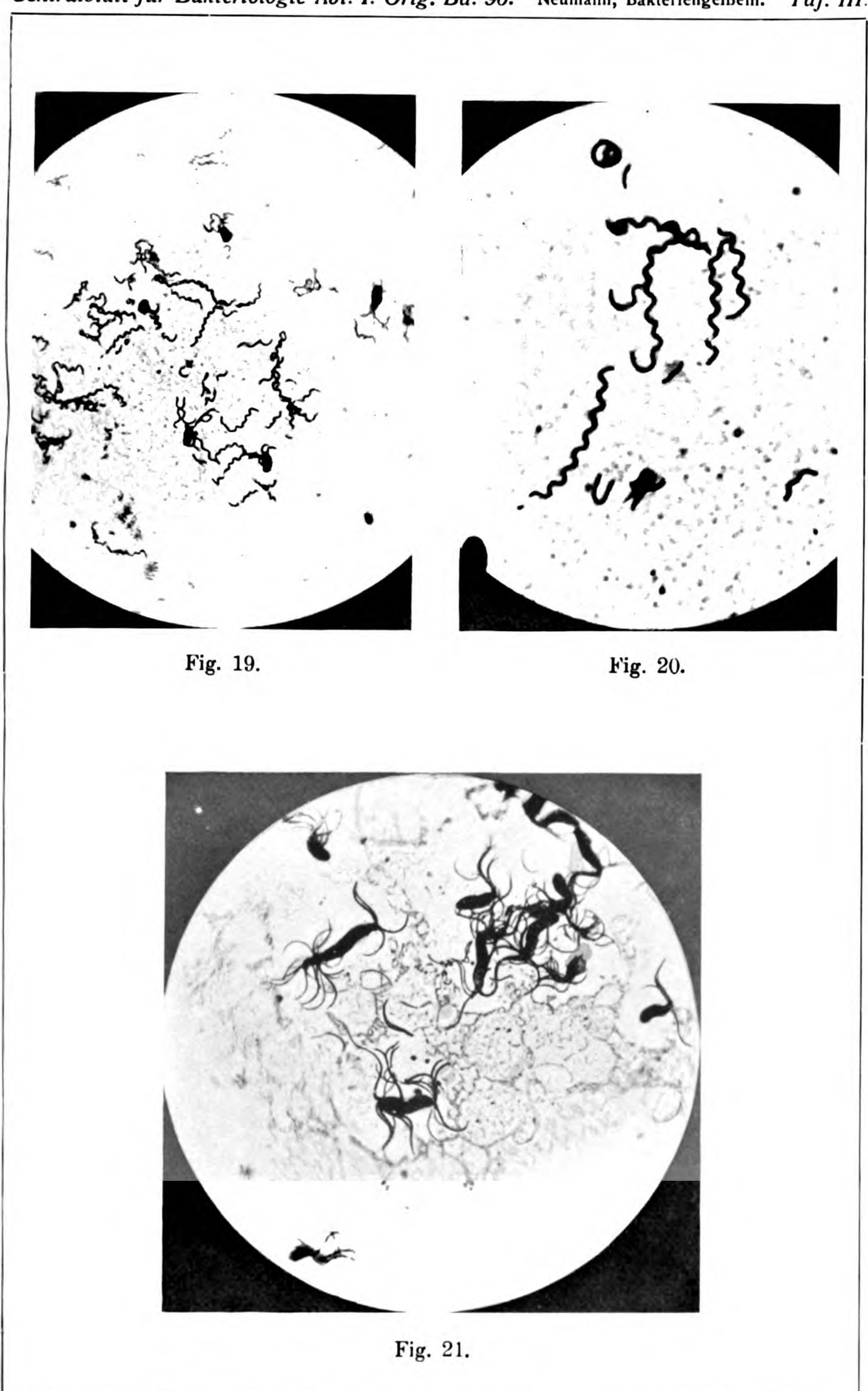


Fig. 19. Fig. 20.

Fig. 21.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.



Fig. 22.

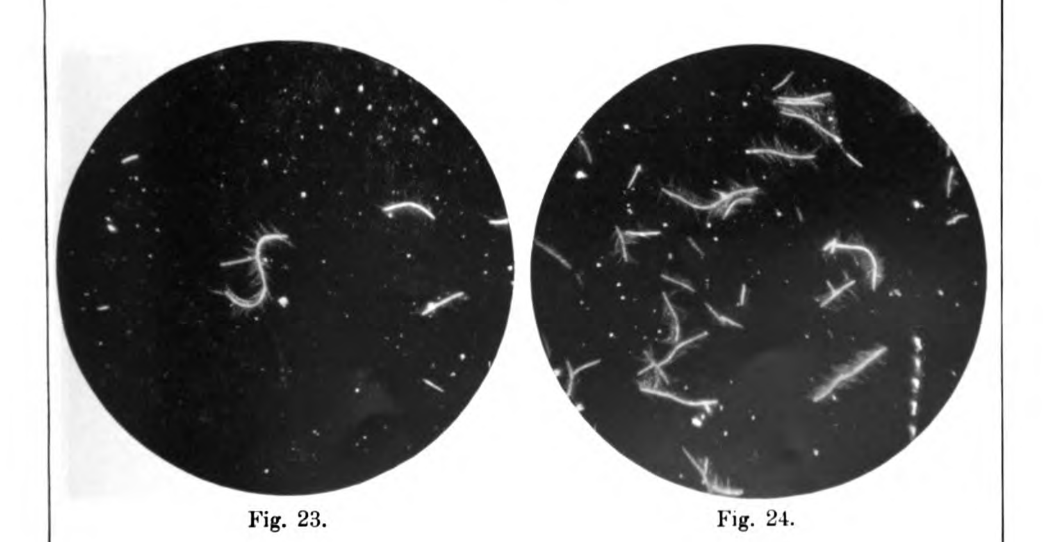


Fig. 23. Fig. 24.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

Indikatoren verdrängt wurden. Sehr zweckmäßig sind die von Clark und Lubs angegebenen und von ihnen zur Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration in den Nährböden angewandten Zweifarbenindikatoren. Allen indirekten Methoden aber haftet ein Fehler an, der durch die Anwesenheit von Salzen und Eiweiß bedingt ist.

Das potentiometrische Verfahren in Form der Gaskette konnte sich nur schwer zur Messung der Wasserstoffionenkonzentration in den Nährböden einbürgern. Bei den nicht zu verkennenden Nachteilen, die der Gaskettenmethode anhaften, so z. B. die große Empfindlichkeit der platinierten Platinelektroden und vor allem die lange Einstellungsdauer des endgültigen Potentials, ist dies nicht verwunderlich. Wohl wurde diese Methodik zu wissenschaftlichen Zwecken vereinzelt benutzt, ihrer praktischen Verwendung zur PH-Messung der Nährböden im bakteriologischen Laboratorium waren enge Grenzen gesetzt. Während für flüssige Nährböden die allgemein üblichen birn- oder U-förmigen Elektrodengefäße verwandt wurden, hat erst neuerdings Radsimowska eine Ansatzelektrode zur PH-Bestimmung in festen Nährböden angegeben, die in gewisser Hinsicht eine Verbesserung der Methodik bedeutet. Radsimowska hat bei seinen Messungen in 15—20 Min. einen endgültigen Potentialeinstand erreicht.

Auch ich versuchte die Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration mit Hilfe des gewöhnlichen Michaelisschen Verfahrens und benutzte zur Aufnahme der festen Nährböden ein der Schadeschen Kammerelektrode ähnliches Gefäß, durch das ein kontinuierlicher Wasserstoffstrom, pro Sekunde etwa eine Blase, hindurchgeschickt wurde. Im Gegensatz zu Radsimowska gelang es mir trotz punktförmiger Berührung der Platinelektrode mit dem Nährboden in keinem Falle, schon nach 15 Min. ein endgültiges Potential zu erreichen. Je nach der Dicke des Nährbodens schwankte die Einstellungsdauer des endgültigen Potentials zwischen $1^1/_2$ und 6 Std., was für eine praktische Anwendung dieser Methodik unbrauchbar ist. Aber selbst in dem Falle, daß die Einstellungsdauer nur 15 Min. beträgt, wäre die Gaskette zur praktischen Einstellung der festen Nährböden auf eine bestimmte Wasserstoffionenkonzentration noch nicht brauchbar, wenn man bedenkt, daß man zur Erreichung des richtigen Potentials meistens mehrere Messungen nach- oder nebeneinander wird machen müssen und inzwischen der Nährboden wieder fest geworden wäre.

Ich versuchte deshalb zur Einstellung der Nährböden auf einen bestimmten Wasserstoffexponenten die Chinhydronkette, die R. Schäfer und ich — siehe dort auch Literatur und theoretische Grundlage — zu klinischen PH-Messungen zuerst benutzten, während schon vorher Christensen und Jensen sie zur Bestimmung der Bodenreaktion angewandt hatten. Ihre großen Vorteile, vor allem die augenblickliche Einstellung des endgültigen Potentials, die Einfachhheit der Apparatur, der Fortfall des Wasserstoffentwicklungsapparates, ihre leichte Handhabung, die schnelle Füllung der Elektrodengefäße, ferner ihre Unempfindlichkeit gegen gewisse chemische Stoffe, die die PH-Messung mit platinierten Elektroden vereiteln, machen sie, wie ich auch im folgenden wiederum feststellen konnte, wie geschaffen zu Massenuntersuchungen.

In der Methodik folgte ich im wesentlichen der von R. Schäfer und mir ausgearbeiteten Versuchsanordnung: Benutzt wurde bei der

potentiometrischen Messung das Kompensationsverfahren von Poggendorf in der Michaelisschen Modifikation mit 2 Präzisionswiderständen und einem Kapillarelektrometer als Nullinstrument. Für die Messung mittels Chinhydronkette benutzte ich ähnlich wie Christensen und Jensen zwei in einer Höhe von 8—10 cm abgeschnittene Reagenzgläser, in die ein doppelt durchbohrter Gummistopfen eingepaßt wurde. In die eine Durchbohrung wird ein U-förmiges Kapillarrohr zur Herstellung der Verbindung mit dem Gefäß voll gesättigter Kaliumchloridflüssigkeit, in die andere ein Glasröhrchen eingeführt, das unten zur Herstellung des Kontaktes mit dem Quecksilber bzw. dem zuführenden Kupferdraht einen dünnen Platinstift trägt. Zwei solcher Gefäße zusammen mit einem Becherglase bilden die ganze Apparatur, die leicht jedermann selbst anfertigen kann. Eine Platinierung der Platinelektroden findet nicht statt.

Das eine der Reagenzgläser dient zur Aufnahme des zu untersuchenden Nährbodens, das andere wird als Chinhydronvergleichselektrode benutzt. Letztere wird mit einer unter allen Kautelen eingestellten Flüssigkeit von der Zusammensetzung 0,01 n-HCl + 0,09 n-KCl unter Zugabe von einigen Chinhydronkristallen (Firma Merck) gefüllt. Die Vergleichsflüssigkeit braucht erst in bestimmten Zeiträumen erneuert zu werden. Die Füllung der zur Aufnahme des zu untersuchenden Nährbodens dienende Elektrode wird so bewerkstelligt, daß man zunächst einige Kubikzentimeter des Nährbodens — ich benutzte stets 10 ccm Bouillon, Agar usw. — hineinbringt und dann einige Kristalle Chinhydron dazugibt. Die Auflösung des Chinhydrons dauert nur wenige Sekunden. Wichtig ist, daß auf dem Boden des Gefäßes etwas Chinhydron in Substanz erhalten bleibt. Dann wird der Gummistopfen aufgesetzt, der ebenfalls 2 Durchbohrungen trägt, die eine zur Aufnahme des Glasröhrchens mit dem Platindraht, die andere zur Aufnahme des mit KCl-Agar gefüllten U-förmigen Kapillarröhrchens. das hier durch seine Verbindung mit der im Becherglase befindlichen KCl-Flüssigkeit die Kette vervollständigt.

Nachdem die Brauchbarkeit der Chinhydronkette durch frühere Untersuchungen an wässerigen Elektrolyten und physiologischen Flüssigkeiten bewiesen war, galt es zu untersuchen, ob und inwieweit diese neue Methodik zur Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration in flüssigen und festen Nährböden Verwendung finden konnte (Tab. I).

Tabelle I.

Nr.	Art des Nährbodens	Chinhydronkette		Gaskette		Indikatoren
		M. V.	P_H	M. V.	P_H	P_H
1)	Bouillon	350	8,12	719	8,09	8,05
		339	7,88	694	7,84	7,8
2)	Galle	345	7,99	.	.	8,0
		343	7,97	.	.	8,0
3)	Mannitbouillon	332	7,76	699	7,74	7,68
		336	7,83	701	7,77	7,8

Tabelle I, die nur einen geringen Bruchteil aller mit flüssigen Lösungen vorgenommenen Messungen zeigt, beweist klar, daß die Chin-

hydronkettenwerte eine genügende Uebereinstimmung mit den Werten ergibt, wie sie mittels der Gaskettenmethode gewonnen wurden. Die Abweichungen gegenüber der Gaskette betragen nicht mehr als 3 Millivolt. Dabei muß betont werden, daß aus den Messungen keineswegs die besten, sondern irgendwelche beliebigen Fälle herausgegriffen wurden. Häufig ist die Uebereinstimmung eine bessere, manchmal sogar eine absolute.

Die letzte Spalte zeigt den Indikatorenwert an. Ich benutzte die zweifarbenen Sulfonphthaleinindikatoren nach Clark und Lubs, die im Doppelkeilkolorimeter nach Bjerrum-Arrhenius (beziehbar durch die Firma Lautenschläger, München, dort ist auch die nähere Gebrauchsanweisung erhältlich) die genauesten Resultate ergibt. Der Apparat gestattet ohne Anwendung von Puffergemischen in kurzer Zeit eine schnelle Messung des Wasserstoffexponenten. Dabei fällt die zeitraubende Herstellung von Vergleichslösungen weg, indem wir durch eine besondere Anordnung der Keile und Zugabe von $^1/_{10}$ n-HCl in den einen und $^1/_{10}$ n-NaOH in den anderen Keil, sowie Indikator in beide auf der einen Seite die maximal saure, auf der anderen Seite die maximal alkalische Farbe, und dazwischen alle Farbnuancen in kontinuierlichem Uebergange auftreten. Außerdem ist der Salz- und Eiweißfehler gering, wenn er auch einen nicht ganz zu vernachlässigenden Faktor darstellt. Störend wirkt die starke Eigenfarbe der Nährböden; diese läßt sich aber durch 3—4fache Verdünnung, wodurch infolge der starken Pufferung der Nährboden durch Salze und Kolloide eine Aenderung der Wasserstoffionenkonzentration nicht eintritt, auf ein Minimum reduzieren.

Nachdem so die Brauchbarkeit der Chinhydronkette zur Bestimmung des Wasserstoffexponenten bei flüssigen Nährböden genügend dargetan ist, lag es nahe, ihre Anwendbarkeit auch bei festen Nährböden zu versuchen. Zu diesem Zwecke bereitete ich mir eine Reihe von wässerigen Regulatorengemischen, stellte ihre Wasserstoffionenkonzentration fest, gab nun steigende Mengen fester Nährböden hinzu — auf die Technik im einzelnen komme ich weiter unten noch zu sprechen — und beobachtete nun, ob und wie sich einmal der Exponent änderte, und ob die Chinhydronkette ein richtiges und konstantes Potential ergab (Tab. II).

Tabelle II.

Nr.	Bezeichnung der Lösung	Gaskette		Chinhydronkette		Indikatoren
		M. V.	P_H	M. V.	P_H	P_H
1)	**Standardazetat** (**flüssig**)	517	4,6	149	4,61	4,6
	„ (+ 2% **Agar**)	516	4,59	150	4,61	4,54
	„ (+ 3% „)	517	4,6	152	4,66	4,52
2)	**Azetatpuffer** (**flüssig**)	531	4,84	162	4,83	4,8
	„ (+ 3% **Agar**)	529	4,81	165	4,88	4,87
3)	**Phosphatpuffer** (**flüssig**)	574	5,59	203	5,54	5,5
	„ (+ 3% **Agar**)	572	5,55	203	5,54	5,48

Auch Tabelle II ist nur ein kleiner Auszug aus der Reihe der geprüften Puffergemische mit Agar. Man sieht, daß auch bei festen Nährböden die Uebereinstimmung zwischen Gas- und Chinhydronketten-

wert einmal mit der gepufferten, flüssigen Lösung, dann aber auch mit dem Puffergemisch + Agar durchaus befriedigend ist. Die größten Abweichungen betragen zwischen Gas- und Chinhydronkette in den ungünstigsten Fällen 3—4 Millivolt. Die Gaskettenwerte wurden, wie bereits erwähnt, gemessen, indem ein dünnes Stückchen Nährboden in ein der Schadeschen Kammerelektrode ähnliches Gefäß hineingebracht wurde und nun ein kontinuierlicher Wasserstoffstrom durch das Elektrodengefäß geleitet wurde. Die Einstellung dauerte stets mehrere Stunden und ist somit für praktische Zwecke unbrauchbar. Die endgültige Einstellung des Potentials der Chinhydronelektrode tritt dagegen sofort auf und hält sich, wenn genügend Chinhydron zugegeben wird, konstant. Wichtig ist aber, daß man den Agar auf eine bestimmte Temperatur — alle meine Angaben beziehen sich auf 20° — abkühlen läßt. Bei 10 ccm Nährboden dauerte die Abkühlung, wie eine Reihe besonderer Versuche ergab, unter fließendem Leitungswasser von der Temperatur 12° C etwa 7—10 Min. Die Indikatorenwerte zeigen, was die wässerigen Elektrolyte anbelangt, wie erwartet, eine gute Uebereinstimmung mit den durch die anderen Methoden gewonnenen Werte. Bei den Puffergemischen + Agar ist die Abweichung, bedingt durch Salz- und Kolloidfehler, eine bedeutend größere, doch ist auch dieses Resultat immerhin brauchbar, da im allgemeinen eine Variationsbreite von P_H 0,1 für das Wachstum der Bakterien keine große Bedeutung hat.

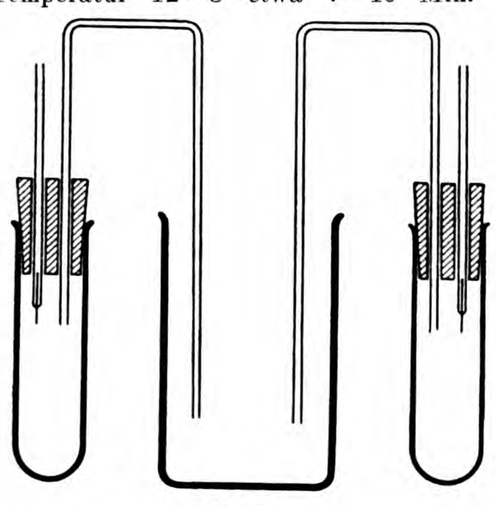


Fig. 1.

Zur praktischen Ausführung einer genauen Einstellung der Nährböden auf einen bestimmten Wasserstoffexponenten, die ich nun beschreiben will, schneidet man sich 4—5 Reagenzgläser in einer Höhe von 10 cm ab und paßt in jedes Gläschen einen Gummikorken mit zwei Durchbohrungen ein, in die, wie oben beschrieben, einmal die U-förmige mit KCl-Agar gefüllte Verbindungskapillare zur KCl-Wanne, sodann das am unteren Ende mit einem freien Platindraht versehene und nach Quecksilberfüllung zur Ableitung über die Kompensationsapparatur dienende Glasröhrchen eingeführt wird. Nachdem man sich vom richtigen Funktionieren der gesamten Apparatur, von der Empfindlichkeit des Quecksilberkapillarelektrometers und guten Kontakten überzeugt hat, füllt man das eine Reagenzröhrchen mit der Vergleichslösung unter Zugabe von etwas Chinhydron, befestigt es an einem Stativ und stellt die Verbindung zur KCl-Flüssigkeit durch Aufsetzen des Gummistopfens mit dem V-förmigen Röhrchen her. Darauf gibt man in die übrigen abgeschnittenen, numerierten Reagenzgläschen eine genau abgemessene Menge des noch nicht alkalisierten flüssigen oder verflüssigten Nährbodens, z. B. 10 ccm Agar. Nun läßt man in jedes der Gläschen eine bestimmte Menge n-NaOH oder Na_2CO_3 — ich benutzte eine 10proz.

Lösung von kristallisierter Soda — zufließen, z. B. in das mit 1 bezeichnete Röhrchen 1 Tropfen = 0,055 ccm, in das mit 2 bezeichnete Röhrchen 2 Tropfen = 0,11 ccm, in das 3. Röhrchen 3 Tropfen = 0,165 ccm, in das 4. Röhrchen 4 Tropfen = 0,22 ccm einer 10proz. Sodalösung. Nach dem Umschütteln wird dann so viel Chinhydron in jedes Gläschen gebracht, daß sich nach erneutem Umschütteln ein geringer Bodensatz von Chinhydron in der Kuppe des Gefäßchens bildet. Sodann wird sofort der Gummistopfen leicht auf das Reagenzröhrchen aufgesetzt, 7—10 Min. unter fließendes Wasser gehalten und nun die Verbindungen zur Kompensationsapparatur durch Eintauchen der zu- bzw. ableitenden Kupferdrähte in das Quecksilber des den Stopfen durchbohrenden Glasröhrchens hergestellt. Die zu untersuchende Flüssigkeit bildet den negativen, die Vergleichselektrode den positiven Pol der Kette. Die V-förmigen Verbindungskapillaren aller an einem Stativ befestigten Reagenzröhrchen tauchen in ein gemeinsames KCl-Gefäß, und man braucht bei Serienmessungen nur den Kupferdraht aus dem Quecksilber des einen in das des anderen Röhrchens zu stecken, und in kürzester Zeit kann man so bei einiger Uebung eine ganze Reihe von Messungen ausführen.

Der Wasserstoffexponent einer Flüssigkeit mit unbekannter H'-Ionenkonzentration läßt sich aus der aus der bekannten Nernstschen Formel abgeleiteten Gleichung

$$P_H^{20} = 2{,}04 + \frac{\pi}{0{,}0581}$$

errechnen, wobei π die gemessene Potentialdifferenz ist, ausgedrückt in Volt. Ich nehme also an, ich will meinen Nährboden auf ein $P_H = 8{,}0$ bringen und habe 2 Liter Agar. Ich brauche diesen Wert nur in obige Gleichung einzusetzen und bekomme

$$8{,}0 = 2{,}04 + \frac{\pi}{0{,}0581}$$
$$\pi = 5{,}96 \cdot 0{,}0581$$
$$\pi = 0{,}346 \text{ Volt.}$$

Wenn also bei einer Einschaltung eines Widerstandes von 346 Ohm in den zur Chinhydronkette zugehörigen Präzisionsrheostaten — vorausgesetzt natürlich, daß die Spannung des Arbeitselementes so reguliert ist, daß 1 Ohm gleich 1 Millivolt ist — das Kapillarelektrometer keinen Strom anzeigt, hat die zu untersuchende Flüssigkeit einen Wasserstoffexponenten von 8,0. Nun zeigt z. B. das in der oben beschriebenen Weise gefüllte

Röhrchen	1	eine Potenzialdifferenz	von	305	Millivolt
„	2	„ „	„	320	„
„	3	„ „	„	348	„
„	4	„ „	„	370	„

Röhrchen 3 hätte also die gesuchte Wasserstoffionenkonzentration. Nun habe ich zur Alkalisierung des Röhrchens 3 (10 ccm Inhalt) 3 Tropfen = 0,165 ccm einer 10proz. Na_2CO_3-Lösung verbraucht; ich würde mithin 33 ccm einer 10proz. Sodalösung brauchen, um die 2 Liter Agar auf einen Wassserstoffexponenten von 8,0 zu bringen.

Bei einem zweiten Beispiel will ich 2 Liter Agar auf ein P_H = 7,9 bringen. Nach obiger Gleichung müßte das Kapillarelektrometer bei 0,340 Volt Stromlosigkeit anzeigen. Das genau wie vorher gefüllte

Röhrchen 1 zeigt eine Potenzialdifferenz von 268 Millivolt
„ 2 „ „ „ „ 304 „
„ 3 „ „ „ „ 332 „
„ 4 „ „ „ „ 368 „

Der Nährboden im Röhrchen 3 ist also zu sauer, in 4 zu alkalisch. Röhrchen 3 würde ein P_H = 7,77, Röhrchen 4 ein P_H = 8,11 haben. Röhrchen 3 entsprechen auf 10 ccm Inhalt 3 Tropfen = 0,165 ccm, auf 2 Liter = 33 ccm 10proz. Sodalösung. Dem Potenzialsprung des Röhrchens 3 und 4 von 332 bis 368 = 36 Millivolt entsprechen auf 10 ccm 1 Tropfen = 0,055 ccm, auf 2 Liter also 11 ccm einer 10proz. Na_2CO_3-Lösung und dem Potenzialsprung von 332 bis 340 = 8 Millivolt entsprechen dann $\frac{11 \cdot 8}{36}$ = 2,2 ccm einer 10proz. Na_2CO_3-Lösung. Ich brauche also, um 2 Liter Agar auf einen Wasserstoffexponenten von 7,9 zu bringen, 33 + 2,2 = 35,2 ccm einer 10proz. Sodalösung. Man gibt die entsprechende Menge Lösung zu, kontrolliert nochmals mit der Kette nach, ob der errechnete Wert stimmt und kann evtl. noch eine Korrektur anbringen, was nach meiner Erfahrung bei sorgfältigstem Arbeiten selten nötig ist. Diese Berechnungsart scheint nur auf den ersten Blick recht schwierig; sie ist sehr einfach, und bei einiger Uebung kann man sie leicht im Kopf bewerkstelligen. Die Zeit, die zur Einstellung der P_H der Nährböden erforderlich ist, ist eine denkbar kurze und nicht viel länger als die Einstellung mit Lackmus, bzw. Phenolphthalein. Zu beachten ist, daß die zugegebene Chinhydronmenge zu den Nährböden nicht zu klein ist, jedenfalls größer, als bei der Messung wässeriger Elektrolyte. Der Bodenkörper muß deutlich in der Kuppe des Reagenzgläschens sichtbar sein. Genau so kann man bei der Bestimmung der $H^{\cdot}$-Ionenkonzentration in flüssigen Nährböden vorgehen, nur gestalten sich hier die Verhältnisse noch weit einfacher, da man die Messungen jederzeit vornehmen kann, und die Abkühlung der Nährböden auf eine bestimmte Temperatur fortfällt.

Wie von mehreren Autoren festgestellt wurde, ist die Chinhydronkette bei höheren Werten als P_H = 8,5 nicht brauchbar. Der Fehler im Alkalischen ist jedoch soweit jenseits derjenigen Werte, wie sie im allgemeinen für bakteriologische Untersuchungen in Frage kommen, daß praktisch dadurch kaum die Verwendbarkeit der Chinhydronkette eine Beschränkung erfahren dürfte.

So sehen wir, daß die Brauchbarkeit der Chinhydronkette für die Einstellung der flüssigen und vor allem festen Nährböden auf eine genaue Wasserstoffionenkonzentration eine gute und daher anzunehmen ist, daß die Messung der aktuellen Reaktion in den Nährböden mit Hilfe der Chinhydronkette sich als einen Fortschritt in der bakteriologischen Laboratoriumstechnik erweisen wird.

Zusammenfassung.

An vergleichenden Untersuchungen zwischen Gaskette und Chinhydronkette wird die gute Uebereinstimmung der aus beiden Methoden

gefundenen Werte zur Messung der H˙-Ionenkonzentration flüssiger wie fester Nährböden gezeigt und die gute praktische Brauchbarkeit der Chinhydronkette zur Einstellung der Nährböden auf eine bestimmte Wasserstoffionenkonzentration infolge ihrer Vorzüge gegenüber der Gaskette, vor allem ihrer momentanen Einstellung auf ein endgültiges Potential bewiesen.

Literatur.

Clark u. Lubs, Journ. of Bact. Vol. 2. 1917. p. 1. — W. Radsimowska, Biochem. Ztschr. Bd. 154. H. 1/2. — H. R. Christensen u. S. T. Jensen, Intern. Mitt. f. Bodenkunde. Bd. 14. 1924. 1. — N. Bjerum, Die Theorie der alkalimetrischen und azidimetrischen Titrierungen. (Ahrens Sammlung chem. und chem.-techn. Vorträge. Bd. 21; Ztschr. f. anal. Chem. Bd. 56. S. 13 u. 81. — O. Arrhenius, Bodenreaktion und Pflanzenleben. Leipzig 1922. — Kolthoff, Gebrauch der Farbenindikatoren. 1922. — Michaelis Wasserstoffionenkonzentration. 1922. — Schade, Die physikalische Chemie in der inneren Medizin. 1923. — R. Schäfer u. Fr. Schmidt, Biochem. Ztschr. Bd. 156. H. 1—4.

Neue Steckwechselkondensoren für Hell- und Dunkelfeldbeleuchtung.

[Aus den optischen Werken von C. Reichert, Wien.]

Von **Oskar Heimstädt.**

Mit 2 Abbildungen im Text.

Schon die ersten der neuzeitlichen Spiegelkondensoren, von der Firma C. Reichert im Jahre 1906 eingeführt, gehörten in die Gruppe der in der Ueberschrift gekennzeichneten Einrichtungen (1). Sie waren als Steckkondensoren ausgebildet, welche in die Klemmhülse des Abbeschen Kondensors gesteckt wurden. Die Dunkelfeldblende konnte aus dem Strahlengange durch Ausklappen um ein Gelenk entfernt werden (Fig. 1) und dadurch zur gewöhnlichen Spiegelbeleuchtung übergegangen werden, da der mittlere Teil der Spiegellinse als Planplatte wirkt. Allerdings war die Apertur der Beleuchtung beschränkt und durch die Größe des Mikroskopspiegels bedingt. Für die Zwecke der Beobachtung im hellen Felde war die Spiegelbeleuchtung allein nicht ausreichend. Dafür war sie auch nicht bestimmt, sondern sie sollte nur dazu dienen, die bei der damaligen Neuheit dieser mikroskopischen Technik schwierige Einstellung zu erleichtern (Fig. 1, S. 270).

Wechselkondensoren für Hell- und Dunkelfeldbeleuchtung, mit deren Hilfe auch Beobachtungen im hellen Felde durchgeführt werden

können, sind vom Verfasser in dieser Zeitschrift (2) beschrieben worden. Es sind dies die Plattenkondensoren *Fb* der Firma C. Reichert, bei welchen die Hellfeldbeleuchtung mit höherer Apertur durch Verwendung einer halbkugelförmigen Linse realisiert wird. Diese Linse kann auch durch eine Mattglasscheibe ersetzt werden, die vom Mikroskopspiegel aus stark beleuchtet wird. Die große Objektnähe und die Ausmaße dieser Mattscheibe sichern eine für gewöhnliche Beobachtungszwecke genügende Größe der Beleuchtungsapertur. Mattscheibe und Linse sind auf einer unterhalb der Spiegellinse angeordneten drehbaren Scheibe befestigt, welche außerdem noch mehrere Dunkelfeldblenden verschiedener Größe zur Abstufung der Lichtzufuhr trägt.

Der große Umfang, welchen die Untersuchungen lebender Bakterien nicht nur in der medizinischen Wissenschaft, sondern auch in der ärztlichen Praxis angenommen hat, hat das Bedürfnis nach Spezialkondensoren wachgerufen, die den Abbeschen Kondensor ersetzen und dabei eine einwandfreie Dunkelfeldbeleuchtung zu liefern imstande sind. Der Weg war durch die früheren Wechselkondensoren der Firma C. Reichert vorgezeichnet.

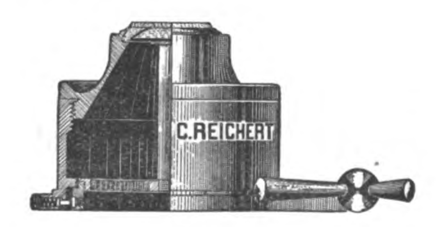


Fig. 1.

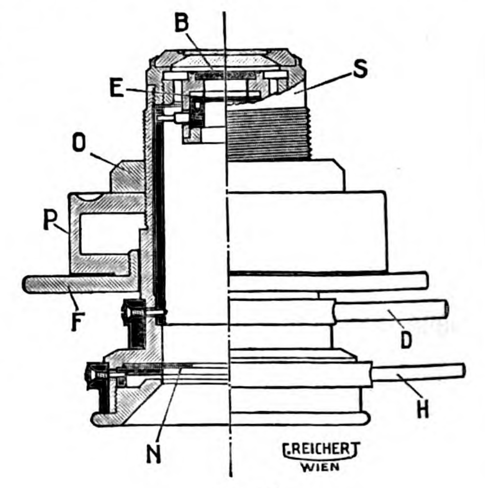


Fig. 2.

Bei Steckkondensoren für Dunkelfeldbeleuchtung, bei welchen die Stephensonsche Spiegellinse oder ein ihr ähnliches Mittel zur Erzeugung des Dunkelfeldes benutzt wird, läßt sich die Umwandlung in Wechselkondensoren für Hell- und Dunkelfeldbeleuchtung sehr leicht dadurch vollziehen, daß man die Zentralblende, welche den Strahlen mit den Aperturen unter 1,0 den Zutritt zum Objekt verwehrt, als Irisblende ausbildet. Ueber dieser Irisblende befindet sich, fest angeordnet, die Hilfslinse oder die Mattscheibe, welche dem Objekt Strahlen mittlerer und geringerer Apertur zuführt. Ist die Irisblende geöffnet, so durchsetzen die Strahlen mittlerer Apertur Objekt und Objektiv. Das Objekt wird dann in hellem Felde abgebildet. Ist die Irisblende dagegen geschlossen, so tritt reine Dunkelfeldbeleuchtung auf.

Die innere Einrichtung eines solchen Kondensors ist in der Fig. 2 im Querschnitt dargestellt. Die Mattscheibe *B*, welche die Hellfeldbeleuchtung besorgt, ist unmittelbar unter der Spiegellinse des Kondensors angeordnet und mit dem Gehäuse der Dunkelfeldirisblende fest

verbunden. Sie wird durch Drehung des Hebels *D* betätigt, welcher ein inneres Rohrstück mitnimmt, das mit dem drehbaren Gehäuse der Dunkelfeldirisblende in Verbindung steht. Die zweite, am unteren Teil des Kondensors angebrachte Irisblende *N* dient zur Abstufung der Lichtzufuhr bei Hellfeldbeleuchtung, wirkt also im allgemeinen als Aperturblende. Sie wird durch Drehung des Hebels *H* geöffnet oder geschlossen (Fig. 2, S. 270).

Ist die obere Irisblende, die Dunkelfeldirisblende, auf Hellfeldbeleuchtung eingestellt, also geöffnet, und die untere Irisblende, die Aperturblende, ebenfalls ganz offen, so wirken die äußeren Strahlenbündel (numer. Apertur 1,1—1,3) und die inneren Bündel (numer. Apertur 0—0,7) zusammen. Die inneren Strahlenbündel kommen nach Maßgabe der Oeffnung der Aperturirisblende unter allen Umständen zur Geltung. Die äußeren nur dann, wenn zwischen Kondensoroberfläche und Objektträger eine optische Verbindung durch eine Immersionsflüssigkeit (Wasser, Zedernöl) hergestellt wird. Ist das zur Beobachtung verwendete Objektiv außerdem ein Immersionsobjektiv, welches mit voller Oeffnung, ohne eingeschaltete Trichter- oder Irisblende, verwendet wird, so ist die Lichtstärke des Kondensors ein Maximum. Wird aber ein Trockensystem zur Beobachtung verwendet und dabei die Immersion zwischen Kondensoroberfläche und Objektträger beibehalten, so überlagern sich Dunkelfeld- und Hellfeldbild; das erstere wird durch Zuziehung der unteren Blende ausgeschaltet.

Die Kondensoren sind so beschaffen, daß sie ohne Schwierigkeit an jedem beliebigen Mikroskop, das für die Aufnahme eines Kondensors eingerichtet ist, angebracht werden können. Da die zur Aufnahme der Kondensoren bestimmten Klemmhülsen bei den Mikroskopen verschiedener Herkunft abweichende lichte Weiten besitzen, sind die neuen Wechselkondensoren mit auswechselbaren Paßringen *P* versehen, die mit verschiedenem Durchmesser hergestellt werden, passend zu den ververschiedenen Mikroskopen[1]). Es ist lediglich nur notwendig, die Kondensoroberfläche auf gleiche Höhe mit der Ebene des Tisches zu bringen. Um das zu ermöglichen, ist der Steck- bzw. Paßring *C* des Kondensors sowie die Anschlagscheibe *F* als Schraubenmutter ausgebildet, die sich durch Drehung auf dem Körper *S* des Kondensors in größerem Ausmaße verschieben läßt. Nach Lösen des Ringes *O*, welcher als Gegenmutter wirkt, wird der Steckring *P* des Kondensors und die Anschlagscheibe *F* so eingestellt, daß die Kondensoroberfläche mit der Tischfläche des Mikroskops in einer Ebene liegt, wenn der Anschlagring *F* der Schiebhülse an den Kondensorträger stößt. Ist diese Stellung erreicht, so wird die Gegenmutter *O* fest angezogen und damit die ständige Justierung des Kondensors für das verwendete Mikroskop gesichert.

Als Lichtquellen kommen alle für die Zwecke der Dunkelfeldbeleuchtung in Gebrauch stehenden in Betracht. Man verwendet entweder die Liliputbogenlampe für Gleich- oder Wechselstrom, die Fixpunktbogenlampe oder die Halbwattlampe. Doch sind auch Niedervolt-

---

1) Soll der Kondensor an Mikroskopen fremder Herkunft angebracht werden, so muß bei der Bestellung die Mikroskopmarke bekannt gegeben oder der innere Durchmesser der Kondensorhülse genau angegeben, bzw. der vorhandene Kondensor selbst eingesandt werden.

lämpchen in Verbindung mit einem entsprechenden Hilfskondensor, wie ihn der nach Arzt benannte Spiegelkondensor (3) der Firma C. Reichert besitzt, mit Erfolg verwendbar. Die Einrichtung des neuen Wechselkondensors ist so getroffen, daß dieser auf Bestellung mit Hilfskondensor und zentrierbarem Niedervoltlämpchen geliefert werden kann.

Literatur.

1) Oskar Heimstädt, Spiegelkondensor für ultramikroskopische Beobachtungen. (Ztschr. f. Chemie u. Industrie d. Kolloide. H. 9. 1907.) — 2) Ders., Apparat z. Dunkelfeldbeleuchtung und für Ultramikroskopie. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 50. 1909. H. 2.) — 3) L. Arzt, Spiegelkondensor mit direkter Beleuchtung. (Wien. klin. Woch. 1920. Nr. 18.)

Aufnahmebedingungen für das Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten.

Die Manuskripte müssen **druckfertig** eingesandt werden. Notwendig werdende Umarbeitungen und Korrekturen können auf Wunsch durch die Redaktion gegen entsprechende Vergütung besorgt werden.

Arbeiten, welche den Umfang von 2½ bis 3 Druckbogen überschreiten, müssen vorläufig von der Aufnahme ausgeschlossen werden, falls die Verff. die Herstellungskosten für den obige Bogenzahl übersteigenden Text nicht zu tragen bereit sind. Auch können **Tafeln, Textfiguren, Kurven, Tabellen** usw. nur in beschränkter Anzahl beigegeben werden. Weitergehende Wünsche können nur Berücksichtigung finden, wenn die über das vorgesehene Maß hinausgehenden Herstellungskosten von den Verfassern getragen werden. Für **zurückverlangte Manuskripte** ist das zur Rücksendung nötige Porto an die Redaktion vorher einzusenden.

Inhalt.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena — 5377.

Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Originale. Bd. 96. Heft 5/6.

Ausgegeben am 2. November 1925.

Nachdruck verboten.

Eine neue Form von Pseudotuberkulose (Pneumomykosis pseudotuberculosa cryptococcica).

Von Dr. **Llamas Torbado** (Apotheker) in Vitoria (Spanien) und **Arciniega** (Militärveterinär und Arzt), Madrid.

Mitgeteilt auf dem hispano-amerikanischen Kongreß für Medizin in Sevilla.

Nach einigen Jahren intensiver Arbeit, welche dem Studium der pathogenen Pilze gewidmet waren, glauben wir, daß das Gebiet der Pseudotuberkulose die ihm gebührende Bedeutung erlangen wird.

Trotz ausgedehnter Beiträge zum Studium der Mykosis pulmonalis herrscht nach Sartory auf diesem Gebiet immer noch ein beklagenswertes Chaos und die Unmöglichkeit einer genauen Klassifikation wegen ungenügender Mittel und Interessen, die auf ihr Studium verwandt sind. Seit der Erforschung des Saccharomyces anginae durch Achalme und Troisier 1893 bis zur jüngsten und vollständigen Forschung von Boquet und Nègre über den Cryptococcus von Rivolta waren 30 Jahre unaufhörlicher Arbeit nicht ausreichend für ein zusammenhängendes Studium jener Krankheiten, welches eine Differentialdiagnose gegenüber der durch den Kochschen Tuberkelbazillus hervorgerufenen Tuberkulose ermöglichen konnte, eine Krankheitsform, mit der die meisten jener Zustände zusammengeworfen werden, zum großen Schaden der Therapie, Krankheitsbilder, welche bestimmte Regeln der Prophylaxe und Therapie erfordern, und die versuchen, einen möglichen Zusammenhang zwischen der Pseudo- und der echten Tuberkulose herzustellen.

Was die Mykosis pseudotuberculosa anbetrifft, so glauben wir, daß sie relativ häufig vorkommt. In weniger als 1 Jahr, seitdem wir uns mit diesem Gegenstande beschäftigen, haben wir 2 Fälle untersucht (pulmonal und peritoneal), ein 3. war suspekt (pulmonal). Dr. Ruiz, der diese Fragen sehr sachgemäß bearbeitet hat, stimmt mit unseren Ansichten, auch in therapeutischer Beziehung, überein.

Hauptbedingung ist die systematische bakteriologische Untersuchung jedes klinisch an Tuberkulose Erkrankten. Besonders im Beginn der Erkrankung ist es jedoch nicht immer leicht, den Erreger festzustellen. Aber man könnte wenigstens so Fälle vermeiden, die, wie der unsrige, wegen seiner offenbar tuberkulösen Aetiologie, allen therapeutischen Bestrebungen entgangen waren.

Krankengeschichte: In der Familie ein Abort; ein Jahr vor der Geburt des Patienten bei einem Geschwister Meningitis.

15jähriger Knabe von guter Konstitution, für sein Alter außerordentlich entwickelt. Vagotonische Diathese; bei der geringsten körperlichen Anstrengung profuse Schweiße.

Mit 12 Jahren Masern ohne Komplikationen. Mit 13 Jahren Fieber von 10-tägiger Dauer, das jedes Jahr wiederkehrt und von doppelseitiger Blepharitis mit leichten Ulzerationen begleitet ist, die leicht ging und wiederkehrte, sobald man aufhörte, mit gelber Präzipitatsalbe zu behandeln. Im Januar 1923 vollständige Ver-

änderung der Stimme, die rauh wird. Monatlich eine Hämoptoe, die sich mit geringerer Intensität nach 3 Tagen wiederholt. Nach einigen Tagen Verschwinden der Blutstreifen, aber mit Fortschreiten der Krankheit Vermehrung des Sputums. Verstärkung des Stimmfremitus auf der linken Thoraxseite, Abschwächung des Atemgeräusches, krepitierendes Rasseln, Schallabschwächung im unteren Teil der linken Axilla. In den folgenden Tagen rasche Ausbreitung dieser Phänomene auf die rechte Seite, aber immer stärker ausgesprochen auf der linken Seite. Puls 110; Temp. 38,5°; auf Antipyretica nicht zurückgehend, rasche Gewichtsabnahme, profuse Schweiße, Dyspnoe und Cyanose.

Diagnose: Akute Lungentuberkulose, pneumonischer Typ. Sputumuntersuchung (Dr. Llamas Torbado) nach der Vorschrift von Lopez Laza und Garaizabal. Schleimig, eitrig, zäh, leicht gelblich-grün, schmutzig, lufthaltig, nicht schaumig, nicht flüssig, mit der Platinöse leicht zu verteilen. Albumen-Reaktion nach Wanner leicht positiv. Untersuchung auf Chloride wegen der geringen Sputummenge nicht ausführbar.

Färbepräparat: Schleimiger Grund, zahlreiche Kernreste von Polynukleären im vorgerückten Stadium der Degeneration und des Zerfalls. Reichliche Bronchialzellen, zahlreiche Alveolarzellen, größtenteils mit exzentrischem Kern, geschwollen und mit deutlichem Verlust der Färbefähigkeit des Zytoplasmas. Keine Makrophagen oder Pigmentzellen aus dem Lungengewebe. Cholestearin- und Hämatoidinkristalle. In zahlreichen nach Ziehl und Spengler gefärbten Präparaten weder Tuberkelbazillen noch andere säure- und alkoholfeste Stäbchen, auch nicht nach Antiforminanreicherung.

In vielen Gesichtsfeldern hat man den Eindruck, als ob sie mit einer Kultur von Stäbchen bedeckt sind, die Beziehung zur Hefe vom Typ Saccharomyces zu haben scheinen, ohne daß ich sie bestimmen könnte, und die ich auch noch nie in der bakteriologischen Literatur erwähnt gefunden habe. Atypischer Muguet? Saccharomyces? Dann finden sich ferner Pneumokokken, Micrococcus catarrhalis, ein Muco-diplostreptococcus, in einigen Feldern ein Pneumobazillus, und eine Unzahl von unbestimmbaren Keimen, seien es pathogene, seien es Saprophyten aus der Flora des Mundes.

Im Sputum erscheinen sie in der charakteristischen Form der Hefe, von ovaler, oder sphärisch-ovaler bis zu elliptischer Form; im allgemeinen in Gruppen angeordnet und bei der Mehrzahl der Hefe geben die an den Polen der Hefe sichtbaren Sprosse ihnen ihren Fortpflanzungs- und Bildungscharakter. Keine Kapseln oder Asci, aber in einigen deutlicher als in anderen Protoplasmagranulierung. Leichte Färbbarkeit mit basischen Anilinfarbstoffen. Gram- und Claudio-positiv.

Wachstum. Wachstum der auf flüssigen oder festen Nährböden (Bouillon, Blutagar, Gelatine) vom Sputum gemachten Aussaaten unvollkommen. Auf Kartoffeln und Mohrrüben rasches, reines Wachstum.

Da bei der gewählten Temperatur von 30° rasches, verhältnismäßig üppiges Wachstum erfolgte, so wurde die Minimal-, Maximal- und die optimale Wachstumtemperatur nicht bestimmt. Bei 30° entwickelten sich schon 24 Std. nach der Aussaat Kolonien, die sich in den folgenden Tagen noch mehr ausdehnten, bis sie das ganze mit dem fraglichen Sputum beschickte Mohrrüben- oder Kartoffelstück überzogen. Die Kolonien sahen auf beiden Nährböden wachsartig-weißlich aus, glänzend, trocken und ohne Rauhigkeiten. Auf den mit Kulturmaterial angefertigten Objektträgerpräparaten färbten sie sich mit Säure-Thionin und mit Gentian violett. Morphologisch waren sie identisch mit den im Sputum gefundenen, auch grampositiv.

Klassifikation: Den bei unserem Kranken gefundenen Pilz rechnen wir zur Ordnung der Askomyceten, Unterordnung der Gymnoasci (nackte Asci), Familie der Saccharomyceten mit Entstehung durch Sprossung (Hefen) und Cryptococcus-Art (Fehlen von Asci), und die Krankheit, die durch sie hervorgerufen wird, Pneumomykosis cryptococcica oder einfacher Blastomykosis pulmonalis pseudotuberculosa.

Experimentelle Pathologie: Experimentelle Verimpfungen wurden beim Kaninchen und Pferd ausgeführt. Fortlaufende, wieder-

holte subkutane Verimpfungen von Sputum und größeren Mengen der in isotonischer Kochsalzlösung gelösten Kartoffel- und Mohrrüben-Kultur an zwei Kaninchen und einem Meerschweinchen blieben negativ, sowohl was den Allgemeinzustand als auch die Impfstelle betrifft. 2 Monate später getötete Tiere zeigten nicht die geringste anatomische Veränderung ihrer Organe.

Beim Pferd zeigte die Impfung 2 verschiedene Phasen. Wir wählten für die Versuche 2 verschiedene Tiere: eins mit einer tadellosen Anamnese. Nach einer subkutanen Injektion mit einer kleineren Kulturmenge als der für das Kaninchen angewendeten am Vorderfuß nahe einer Lymphdrüsenkette zeigte sich nach 24 Std. ein generalisiertes, heißes, schmerzloses Oedem, dessen Punktion eine sanguinolente Flüssigkeit ergab, in der sich, eingeschlossen in Polynukleäre mit ihren morphologischen Charakteristika, eine große Menge von mit denen des Sputums und den Kulturen identischen Cryptokokken befanden.

Die Kultur dieser Kryptokokken erzeugte dieselben Kolonien wie die des Sputums. Nach 60 Std. hatte sich das Oedem in einen kalten Abszeß umgewandelt, bei dessen Punktion ein rahmiger Eiter entleert wurde von ähnlicher Beschaffenheit, wie der, welcher sich bei den infarzierenden Ulcera der Lymphangitis epizootica zu entleeren pflegt, und dessen bakteriologische Untersuchung negativ war, als Zeichen, daß eine vollständige Phagozytose des Cryptococcus eingetreten war. Der Abszeß resorbierte sich nach 4 Tagen, und während eines Jahres zeigte das Tier keinerlei Krankheitserscheinungen.

Das 2. Tier hatte 4 Monate vorher eine durch den Cryptococcus Rivolta verursachte Lymphangitis epizootica durchgemacht, von der es geheilt war. Unter denselben Bedingungen wie das 1. Tier infiziert, zeigte es nach 24 Std. ein Oedem vom selben Charakter, das sich ebenfalls in einen Abszeß umwandelte. Nach 10 Tagen fingen die geheilten Lymphdrüsen an, sich zu infarzieren, ohne zu ulzerieren. Merkwürdigerweise steigerten sich bei dem Pferd, das während seiner spontanen Erkrankung durch den Cryptococcus Rivolta nur leichte Erscheinungen von Lungenödem gezeigt hatte, die Symptome vor der 2. experimentellen Impfung mit dem neuen Parasiten. Die Reaktion von seiten der Lymphdrüsen und Lungen verschwand langsam, und nach 1 Monat war es von seiner artifiziellen Erkrankung geheilt und zeigt jetzt keine krankhaften Veränderungen mehr. Es ist eigenartig, daß dieses Pferd trotzdem außerordentlich für multiple Abszesse durch irgend ein Trauma disponiert ist.

Vergleichende Anatomie: Aus dem Resultat der zuletzt gesetzten Impfungen kann man eine enge Beziehung zwischen unserem Cryptococcus und dem Erreger der Lymphangitis epizootica des Pferdes ableiten. Trotzdem sind die beiden Kryptokokken hinsichtlich der Morphologie und der biologischen Eigentümlichkeiten verschieden. Im Gegensatz zu dem von uns gefundenen Cryptococcus nimmt der Cryptococcus Rivolta in den Kulturen an Volumen zu und nimmt verschiedene Formen an, ebenso runde und ovale, wie Myzelformen färbt sich schwer, auch nach Gram, und seine Kulturen sind vorgewölbt, leicht faltig und dunkelbraun gefärbt.

Folglich ist der Schluß nicht erlaubt, eine Uebertragung dieser Krankheit vom Pferde auf den Menschen zu mutmaßen, trotzdem die Ansteckung nach den Arbeiten von Rollin, Braielt, Nègre und Brid gelungen ist.

Ebensowenig besteht eine Beziehung zwischen dem von uns beschriebenen Cryptococcus und dem von Carpano bei 2 rotzverdächtigen Pferden gefundenen, dem in den Lungenspitzen eines Meerschweinchens gefundenen Cryptococcus niger, mit dem Granulomatogenes von San Felice, dem Bewohner der käsigen Knötchen in der Lunge eines Schweines, noch mit dem Lithogenes desselben Autors, der ihn in den Lymphdrüsen eines an primärem Leberkarzinom gestorbenen Rindes fand.

Der 2. Fall, in dem wir den Cryptococcus gesehen haben, betraf eine Kranke mit Lebertumor und Ascites. Dieser Prozeß gleicht in seiner Pathogenese der von San Felice beim Rind und von Guiart beim Menschen beschriebenen Affektion. Von gleichen morphobiologischen Eigentümlichkeiten, wie in unserem 1. Fall, wich er jedoch bemerkenswert vom Cryptococcus lithogenes und Saccharomyces Blanchardi ab.

Differentialdiagnose gegenüber den übrigen Lungenblastomykosen des Menschen:

Die blastomykotischen Zustände der Lunge sind, abgesehen von den zitierten Fällen, unvollkommen studiert. Der in einer Lungenkaverne einer Leiche gefundene Cryptococcus cavicola gibt auf Grund der Krankengeschichte keine ausreichenden Verdachtsmomente, daß ihm die Pseudotuberkulose ihre Entstehung verdankt. Außerdem waren die Kartoffel- und Mohrrübenkulturen zinnoberrötlich gefärbt.

Bei einer bei akuter Miliartuberkulose gefundenen Hefe fehlten die Kulturen, um ihre Fadenbildungen zu studieren. Die Kartoffelkulturen von Saccharomyces-Etienne sind weißgrau und punktförmig. Die klinischen Verschiedenheiten von den übrigen pathogenen Saccharomyceten sind noch größer, außerdem sind bei ihnen die charakteristischen Asci immer vorhanden, und wenn wir von der pulmonalen, kongestiven, durch den Saccharomyces Le Monnieri erzeugten Art, die morphologisch und kulturell unserem Erreger in keiner Weise gleicht, absehen, so sehen wir, daß alle übrigen keine pulmonalen Formen hervorrufen, sondern anginöse (Saccharomyces angina, membranogenes, labialis, granulatus) oder generalisierte (Blastomykosis californiana).

Dieselben morphologischen, biologischen und klinischen Verschiedenheiten bestehen gegenüber dem Cryptococcus Pilosae, Cr. Lesieure, Cr. sulfureus, Hefepilz von Bread, Cryptococcus Copelli und Cr. Clerc-Sartory.

Klinische Diagnose. Die Differentialdiagnose gegenüber der Tuberkulose ist nicht möglich. Trotzdem muß man den raschen Krankheitsverlauf, die negativen Angaben in der Vorgeschichte des Kranken, den brüsken Charakter und die Schwere des Bildes in Betracht ziehen.

Man könnte daran denken, durch eine energische Reaktion mit abgetöteten, genügend präparierten Kryptokokken die Diagnose zu sichern.

Immunität. Nach den beim Pferde angestellten Impfungen muß man wohl das Vorhandensein einer Immunität auf Grund der Kryptokokken ablehnen. Trotzdem kann man an eine partielle langsame Immunität denken, da ja die Impfung mit Kryptokokken immer beniguer als die natürliche Infektion verläuft, und unter diesen Bedingungen könnte für die Behandlung die Anwendung von Pferdeserum von Nutzen sein.

Behandlung. Jodkali, in kleinsten Dosen 10 Tage vor dem Tode des Kranken verabfolgt, besserte den Zustand des Kranken und das Aussehen des Sputums etwas.

Nach Beobachtungen von Belin und Velu konnte man daran denken, die von ihnen bei der Lymphangitis epizootica des Pferdes empfohlene Pyotherapie anzuwenden. Andere bei dieser Krankheit angewendete Behandlungsmethoden sind die Leukozyten-Therapie (Bridré), die unspezifische Serumtherapie mit nichtpathogener Hefe (Boquet-Nègre), die spezifische Serumtherapie mit Serum von Tieren, die nach Lymphangitis geheilt waren (Latour), und die Antigentherapie (Nicolle, Fayet, Truche) mit Bierhefe. Endlich hat Bridé die Lymphangitis des Pferdes erfolgreich mit Salvarsan behandelt und Roudemer gleichfalls mit Erfolg mit Neosalvarsan. Da das Salvarsan auch mit sehr günstigem Erfolg in 2 Fällen von Aktinomykose des Menschen durch Dr. Ruiz de Arcante angewendet wurde, so glaubten wir, es als das Medikament der Wahl vorschlagen zu dürfen. Da zwischen dem Cryptococcus des Menschen und des Pferdes weitgehende Analogien bestehen, so halten wir in zweifelhaften Fällen die Verabreichung eines spezifischen Serums für unerläßlich.

Prophylaxe. Die Infektiosität der Krankheit ist zweifellos. Bei Fehlen von Drüsenaffektionen ist es folgerichtiger, an einen aërogenen Ursprung zu denken, wie im 1. Fall. Beim 2. Fall ist der Ursprung zweifelhaft.

Nachdruck verboten.

Weitere Untersuchungen über Enterokokken.

[Aus der Bakteriologischen Untersuchungsanstalt der Stadt Dresden (Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Schmorl).]

Von Dr. **Hermann Schmitz**, Oberarzt der Anstalt.

Wie ich bei meinen ersten Untersuchungen über Enterokokken 1913 (1) sagte, hat diese zuerst von Thiercelin und auch später vorwiegend von den Franzosen (neben den Engländern und Amerikanern: von diesen „Streptococcus faecalis“ genannt) beschriebene Kokkenart in Deutschland noch nicht die ihnen gebührende Anerkennung gefunden. Mit Recht betont Kurt Meyer (2), daß auch meine damalige Arbeit dem Enterococcus nicht die Beachtung der deutschen Bakteriologen zu vermitteln vermochte. So werden auch heute in den deutschen Lehrbüchern der Bakteriologie die Enterokokken entweder gar nicht erwähnt, oder mit wenigen Worten als identisch oder nahe verwandt mit dem Streptococcus lacticus abgetan. Nur die 5. Auflage von Heims Lehrbuch bringt S. 459 bei den Darmbakterien eine kurze Besprechung dieser Kokkenart. Selbst in dem 1919 erschienenen Verzeichnis der vormals Králschen Sammlung von Mikroorganismen in Wien wird man vergebens nach einem Enterococcus-Stamm suchen.

In den folgenden Zeilen möchte ich daher nochmals auf das Vorkommen und die Bedeutung der Enterokokken als Krankheitserreger

hinweisen. Abgesehen von den 1913 (l. c.) genannten, meist französischen Veröffentlichungen fand ich seit dieser Zeit (die ausländische Literatur stand mir in den Originalen nicht mehr zur Verfügung) nur folgende kurze Referate über den Enterococcus. Aus denselben geht hervor, daß die Enterokokken normale Bewohner des Dünndarmes sind, unter Umständen eine pathogene Einwirkung nicht nur auf den Verdauungskanal auszuüben vermögen, sondern auch bei Eiterungsprozessen besonders in der Bauchhöhle, bei Kriegswunden, dann vor allem bei Infektionen der Gallen- und Harnwege häufig gefunden wurden und auch in die Blutbahn übertreten können.

Chonkeritsch (3) zählt den Enterococcus zu den 3 im Dickdarm der Pferde, Rinder und Schafe vorherrschenden Bakterienarten.

Dukot (4) gewann einen Enterococcus-Stamm aus tuberkulösem Sputum und stellte Impfversuche beim Meerschweinchen an.

Auch von anderen französischen Autoren ist der Enterococcus „le microbe asocié au bacille de Koch le plus important", der sich auch als Erreger chronischer Bronchopneumonien nachweisen ließ.

Gilbert und Lippmann (cit. bei Kurt Meyer) fanden den Enterococcus beim Hund als einen sehr häufigen Bewohner der Gallenwege.

Donaldson (5) beschreibt ausführlich die Morphologie der Enterokokken und konnte dieselben unter andern aus dem Uterus und der Blase einer 8 Tage post partum an Puerperalfieber erkrankten Wöchnerin rein züchten und hatte die Vakzinebehandlung mit diesem Stamm guten Erfolg (6).

Gleichfalls mit Erfolg bei lokalisierten und Allgemeininfektionen durch Enterococcus wandten die Vakzinebehandlung an Thiercelin und Cepède (7); ihnen gelang auch die Züchtung aus dem Blut bei einer Enterokokkensepsis. Der erstere glaubt, da die Enterokokken im Gegensatz zu den gewöhnlichen Streptokokken auf menschlicher Plazenta sehr üppig wachsen und auch auf den gewöhnlichen Nährböden selbst bei Zimmertemperatur gedeihen, sie wenigstens in gewissen Fällen als Erreger des Puerperalfiebers ansehen zu dürfen.

Bei Kriegswunden fanden unter den Aërobiern häufig den Enterococcus Tessier (9) und Hautefeuille (10).

Bei einer Nahrungsmittelvergiftung gelang der Nachweis einmal Sacquépée (11) in dem angeschuldigten gesalzenen Speck und in den Stühlen der Erkrankten; dann Caysel (12) im Blut der Erkrankten nach dem Genuß von Hammelfleisch. Auch fand er ihn in großen Mengen in den Stühlen der Kranken neben dem Bac. Gärtner und in dem verdächtigen Fleisch in Reinkultur. Eine Erhöhung der Virulenz der Enterokokken durch symbiotisches Wachstum mit Bazillen der Typhusgruppe wird von vielen Forschern betont. V. Wiesner (13) fand Enterokokken häufig bei Typhus- und Ruhrfällen mit protrahiertem Verlauf, ebenso bei Typhusleichen mit diffuser katarrhalischer Entzündung der Darmschleimhaut.

Bocchi (14) fand in einem Fall von Occlusion des Colon ascendens in dem während der Operation (Enteroanastomose) oberhalb der okkludierten Stelle entnommenen Darminhalt neben Streptokokken den Enterococcus. Bei ihren bakteriologischen Untersuchungen von 160 Appendicitisfällen fanden Bagger und Mikkelsen (15) in 25 Proz. Coli-Bazillen und Enterokokken und in 2 Proz. den Enterococcus in Reinkultur.

Peckkam (16) fand bei einer Ruhrepidemie von 12 Fällen in einem englischen Armenhaus als Erreger den Enterococcus, wahrscheinlich aus einem aufgerissenen Fußboden stammend. Ueber die Beziehungen der Enterokokken zur Tropendysenterie machte Greig (17) eine vorläufige Mitteilung: Die Arbeit wird nicht besprochen.

Courtois, Suffit, Trastour (18) beobachteten bei einem jungen Manne eine Reihe von Fieberanfällen von 2tägiger Dauer, in längeren Zwischenräumen auftretend. Während mehrerer Anfälle konnten sie im Blut des Kranken den Enterococcus in Reinkultur nachweisen.

Ein Gleiches gelang Hudelo-Dekerain (19) in 2 gleichen Fällen und in einem Fall mit Herpes.

Endlich berichten über die Toxine der Enterokokken Rosenthal und Chazarain (20) sowie Gernez et Razemon (21).

Macaigne widmet dem Enterococcus in dem 1920 erschienen Handbuch von Roger, Widal, Trissier ein eigenes Kapitel; der Engländer Dibble hat 1922 eine eingehende Arbeit über den „Streptococcus faecalis" veröffentlicht.

Abgesehen von früheren Arbeiten (Escherig, Sittler usw.), ist in der deutschen Literatur herzlich wenig über den Enterococcus zu finden. Erst in neuerer Zeit, nachdem die bakteriologische Untersuchung des Duodenalsaftes und der Galle sich zu unserem diagnostischen Rüstzeug beigesellt hat, scheint der Nachweis der Enterokokken wieder größere Bedeutung zu gewinnen. Vor allem ist hier neben Sittler, Bogendörfer, Bossert, van der Reis usw. die verdienstvolle Arbeit von K. Meyer zu nennen; er sieht übereinstimmend mit mir in dem Enterococcus einen Sondertypus der Streptokokken (m. E. zwischen Pneumokokken und Streptokokken stehend), und hat die Pathogenität der Enterokokken vor allem für die Infektion der Gallenwege (es gelang ihm der histologische Nachweis der Enterokokken in der Gallenblasenwand) und der Harnwege endgültig bewiesen. Er betont die zwischen Enterokokken und Coli-Bazillen bestehende Analogie und nimmt für beide Infektionen eine enterogene Genese an.

In den letzten Jahren habe ich nach längerer Pause mein Augenmerk wieder auf das Vorkommen der Enterokokken gerichtet und kann meine Angabe von 1913, daß dieselben im Stuhl von gesunden Erwachsenen nur selten vorkommen, nur bestätigen — im allgemeinen gilt er hauptsächlich nur als ein normaler Bewohner des Dünndarmes —; auch in vielen Hundert Rachenabstrichen gelang mir, im Gegensatz zu französischen Berichten, der Nachweis nur in einzelnen Fällen. Im übrigen haben meine Untersuchungen wesentlich Neues hinsichtlich der Morphologie dieser Kokkenart nicht ergeben, stimmen aber mit den Angaben K. Meyers und Donaldsons in fast allen Punkten überein. Kapselbildung konnte ich, im Gegensatz zu meiner Angabe 1913, nicht mehr beobachten; zur Prüfung der Tierpathogenität fehlte mir leider das nötige Tiermaterial. Betonen möchte ich als Charakteristikum 1) die große Polymorphie, wie sie in solchem Maße bei keiner anderen Kokkenart anzutreffen ist: Größe, Gestalt und Anordnung der Enterokokken ist im Ausstrich (je nach Herkunft des Materials) und vor allem in der Kultur je nach der Art des Nährbodens außerordentlich verschieden. Besonders hinweisen möchte ich hier auf eins, nämlich, daß die einzelnen Kokken fast nie ganz rund erscheinen, sondern meist (in der Kultur vor allem) seitlich abgeplattet (Brikettform) sind und in den kurzen Ketten eine paarweise Anordnung zeigen. [Auch K. Meyer betont, „die einzelnen Glieder beim Streptococcus viridans sind rundlich".] 2) Die Anspruchslosigkeit hinsichtlich des Nährmaterials (sie wachsen auf allen gewöhnlichen Nährböden auch bei Zimmertemperatur); 3) ihre Widerstandsfähigkeit gegen Erhitzen und gegen Austrocknen; 4) sind sie ein starker Säurebildner, verflüssigen die Gelatine nicht und zeigen auf der Blutplatte keine Hämolyse.

Zu diesen, im allgemeinen wohl zur Differenzierung ausreichenden Merkmalen ist noch, besonders durch die Untersuchungen von K. Meyer, hinzugekommen: Die Enterokokken sind optochinunempfindlich, galleunlöslich, vergären „in der Regel" Mannit unter Säurebildung. Nach meiner Erfahrung, in Uebereinstimmung mit der Ansicht von Jouhaud [Diss.] Paris 1903, werden die verschiedenen Zuckerarten nicht von ihm zersetzt. Nach Rochaix (22) wachsen sie auf Aevulinagar

unter Schwärzung des Nährbodens, die Streptokokken ohne Färbung, und die Pneumokokken überhaupt nicht; und nach Weißenbach (23) „entwickeln sich die Streptokokken in dem von ihm angegebenen Traubenzucker-Galle-Peptonwassernährboden, sie unterscheiden sich hierdurch von den Enterokokken".

Meine Untersuchungen erstrecken sich zunächst auf eine Anzahl Mandelabstriche und Stühle von Leuten, die vor längerer oder kürzerer Zeit an ruhrähnlicher Enteritis erkrankt waren und noch länger mit kurzen Unterbrechungen an Durchfällen litten. Bei der Mehrzahl der Kranken war der Darmerkrankung eine Angina vorausgegangen, oder es bestand bei ihnen zur Zeit meiner Untersuchungen noch eine chronische Tonsillitis. Unter 20 Fällen dieser Art fand sich der Enterococcus 3mal im Mandelabstrich und im Stuhl, je einmal nur im Halsabstrich bzw. Stuhl. Häufiger fand ich ihn im Stuhl bei an chronischer Enteritis leidenden Säuglingen und Typhusrekonvaleszenten, ferner fand sich der Enterococcus 4mal im Harn, 2mal in einem Pleurapunktat, je 1mal in einem Bauchpunktat bei Peritonitis und einem Douglas-Exsudat, 1mal im Blut beim Lebenden, 1mal im Leichenblut, endlich fand er sich im Harnröhrensekret nach überstandener Gonorhoe, wo sich wiederholt keine Gonokokken nachweisen ließen. [Beobachtungen von Dreyer (24).]

Im Gegensatz zu K. Meyer und Gorke ist mir dagegen der Nachweis im Duodenalsaft und Galle bisher nur in wenigen Fällen gelungen.

Nach Obigem erscheint mir kein Zweifel zu bestehen, daß der Enterococcus nicht nur im Verdauungskanal eine pathogene Rolle spielen kann, sondern auch für eine Reihe anderer Erkrankungen lokaler oder allgemeiner Natur von großer, klinischer Bedeutung ist. In den Fällen, wo man ihn in Reinkultur findet, ihn als Erreger des betreffenden Krankheitsprozesses anzusehen, dürfte seine Berechtigung haben.

Literatur.

1) Schmitz, Centralbl. f. Bakt. Orig. Bd. 67. 1913. S. 51. — 2) Kurt Meyer, Klin. Woch. Bd. 50. 1924. S. 2291. — 3) Chonkeritsch, Centralbl. f. Bakt. Ref. Bd. 59, S. 44. — 4) Dukot, Ebenda. Bd. 64. S. 39. — 5) Donaldson, Berl. Klin. Woch. Bd. 30. 1917. S. 734. — 6) Ders., Centralbl. f. Bakt. Ref. Bd. 63. S. 75. — 7) Thiercelin et Cepède, Centralbl. f. Bakt. Ref. Bd. 69. S. 94. — 8) Dies., Ebenda. Bd. 43. S. 242. — 9) Tissier, Centralbl. f. Bakt. Ref. Bd. 67. S. 75. — 10) Hautefeuille, Ebenda. Bd. 71. S. 154. — 11) Sacquépée, Centralbl. f. Bakt. Orig. Bd. 67. S. 52. — 12) Caysel, Centralbl. f. Bakt. Ref. Bd. 67. S. 528. — 13) v. Wiesner, Wien. Klin. Woch. 1925. S. 1278. — 14) Bocchi, Centralbl. f. Bakt. Orig. Bd. 67. S. 520. — 15) Bagger u. Mikkelsen, Münch. med. Woch. Bd. 44. 1924. S. 1552. — 16) Peckkam, Centralbl. f. Bakt. Ref. Bd. 72. S. 410. — 17) Greig, Baumgartens Jahresber. Bd. 17. II. S. 820. — 18) Courtois, Suffit, Trastour, Ebenda. Bd. 17. S. 20, 248. — 19) Hudelo-Dekerain, Ebenda. Bd. 17. — 20) Rosenthal u. Chazarain, Ebenda. Bd. 20. I. S. 248. — 21) Gernez-Razemon, Centralbl. f. Bakt. Ref. Bd. 78. S. 20. — 22) Rochaix, Ebenda. Bd. 78. S. 60. — 23) Weissenbach, Ebenda. Bd. 71. S. 176. — 24) Dreyer, Ebenda. Bd. 67. S. 52.

Bakteriophagenähnliche Erscheinungen bei Milzbrand.

[Aus dem Hygienischen Institut der deutschen Universität in Prag (Vorstand: Prof. Bail).]

Von Dr. **Shokichi Katzu.**

Mit 1 Tafel.

Im April des vorigen Jahres übernahm ich von Prof. Bail zum Zwecke von Tierversuchen 2 ältere Schrägagarkulturen von Milzbrand, deren eine als „Vakzin", die andere als „Virulent" bezeichnet war. Von den daraus gemachten Abimpfungen blieben je 2 Schiefagarkulturen bei Zimmertemperatur ungefähr 2 Monate stehen. Nach dieser Zeit hatten sich bei „Vakzin" in dem leicht eingetrockneten Rasen zahlreiche runde Löcher gebildet, welche den ganzen Rasen bis auf den Agargrund durchsetzten, also bei Ansicht von oben und der Seite als kreisrunde Vertiefungen erschienen, in deren Tiefe der Agar noch mit einer dünnen, fast durchsichtigen Schicht überzogen war. Auf der anderen Kultur „Virulent" fehlte dieser, ganz auffallend an die durch Bakteriophagen gebildeten Löcher erinnernde Befund. Als aber diese Kultur, sowie neue Abimpfungen derselben, in einen Brutschrank von 42° gestellt, daselbst 2—5 Tage belassen und dann bei Zimmertemperatur aufbewahrt wurden, trat auch bei ihnen eine ähnliche Lochbildung auf. Es schien also, als ob durch die übliche Abschwächungstemperatur von 42° das Auftreten dieser zunächst als Bakteriophagen gedeuteten Löcher auch in vorher nicht befallenen Stämmen herbeigeführt werden konnte.

Es wurden nun zahlreiche, zum Teil langdauernde Versuche angestellt, um über die etwaige bakteriophage Herkunft dieser Löcher ins klare zu kommen und die ganze Erscheinung näher zu studieren. Als diese Untersuchungen sich ihrem Abschluß näherten, erschien eine Arbeit von Pesch aus dem Kölner Institut (dieses Centralbl. Bd. 93. S. 525), der bei einem als apathogen bezeichneten Stamme [sonst unbekannter Herkunft? ebenfalls künstlich abgeschwächt?] Beobachtungen machte, die mit den eigenen sehr übereinstimmen.

Es handelt sich ohne Zweifel um die gleiche Erscheinung, die an 2 voneinander bestimmt unabhängigen Kulturen aufgetreten war; denn der eigene Stamm geht auf einen spontanen Milzbrandfall beim Rinde aus der Slowakei im Jahre 1922 zurück. Die von Pesch gebrauchten Bezeichnungen werden soviel als möglich auch für die eigenen Beobachtungen verwendet.

Alle Versuche, in den lochbildenden Kulturen die Gegenwart eines Bakteriophagen nach den bekannten Methoden nachzuweisen, sind fehlgeschlagen. Ausschneiden der Agarfläche mit Löchern und Verreiben derselben mit Fleischbrühe hätte bei Gegenwart von Bakteriophagen, nach Art der bisher studierten, eine Flüssigkeit ergeben müssen, die bei nicht lochbildenden Stämmen eine Beeinflussung hätte ergeben sollen. Durch Filtration, Zentrifugieren, vorsichtiges Erhitzen wurde Befreiung von den anhaftenden Bakterien erreicht, aber niemals rief diese Flüssigkeit weder auf festen, noch in flüssigen Nährböden die gleiche Erscheinung bei normalen Stämmen verschiedener Herkunft hervor.

Daraus soll aber nur der Schluß gezogen werden, daß ein Bakteriophage nach Art der bisher genauer studierten sicher nicht vorhanden ist. Denn es ist wohl anzunehmen, daß die verwickelte Erscheinung der Bakteriophagie erst in den Anfängen bekannt ist und daß die als Kennzeichen derselben angesehenen Lösungserscheinungen den Begriff der Bakteriophagen keineswegs erschöpfen. Auch wenn Lochabimpfungen in Fleischbrühe zunächst 1—10 Tage bei 37° unter Wachstum der mitübertragenen Bakterien bebrütet und dann erst keimfrei gemacht wurden, konnte keine Lochbildung mit anderen Stämmen erzielt werden.

Impft man von Löchern ab und streicht auf Platten aus, so erhält man nach 1 Tag Brutschrankaufenthalt Kolonien, die in der Hauptsache die typische Milzbrandform mit den gewundenen Fädenbündeln der Randpartien zeigen, aber noch keine Löcher ausgebildet haben. Diese treten später, am schönsten bei Aufbewahrung in Zimmertemperatur auf, etwa vom 4. Tage ab, und ergeben schließlich Bilder, wie das in Fig. 1, wo fast keine der bei isolierter Stellung sehr groß gewordenen Kolonien, ohne mehrere, bis zahlreiche Löcher gebildet ist. In geringer Zahl und zerstreut finden sich Kolonien von größerer Dichte und mehr runder Form, die sicher den von Pesch als „krauskopfähnlich" bezeichneten entsprechen. In diesen trat niemals Lochbildung auf.

Impft man von den Lochkolonien weiter ab, so entsteht, gleichgültig, ob man Material aus den Löchern selbst oder von lochfreien Stellen entnimmt, immer das gleiche Bild. Fortsetzung der Plattenzüchtung, wobei immer in Abständen von 5—7 Tagen abgeimpft wurde, ergab auffallenderweise keine Verstärkung, sondern eher eine Abschwächung des Auftretens von Löchern. Sie blieben zwar nie aus, wurden aber nicht so groß und deutlich und waren weniger zahlreich. Die Fähigkeit der Durchlöcherung scheint sich am besten zu entfalten, wenn man die Kulturen auf Schrägagar anlegt und erst in langen Zwischenräumen von 2 und mehr Wochen überimpft.

Die Ausbildung der Löcher ist in den Einzelheiten nur sehr schwer zu verfolgen. Zunächst entstehen auf der vorher gleichmäßigen Oberflache runde Auswüchse, die mit den bekannten Kolonieknöpfen Aehnlichkeit haben. In ihnen, soweit beobachtet wurde, niemals in der normal bleibenden Kolonie, bilden sich die Löcher aus, zunächst klein und wenig eingesenkt, später in die Fläche und Tiefe hinab bis zum Agar greifend. Der Rand ist deutlich anders, häufig weißlich abgehoben. Die vergrößerte Zeichnung einer Einzelkolonie in Fig. 2 kann die Details nur unzureichend wiedergeben. Die Lochbildung hat ohne Zweifel eine große Aehnlichkeit mit derjenigen, die Okuda u. a. bei Pyocyaneus beschrieben haben und bei der echte Bakteriophagen beteiligt, aber auch nur dann sicher nachweisbar sind, wenn man einen geeigneten, empfindlichen und bakteriophagenfreien Stamm zur Verfügung hat. Aus diesem Grunde hauptsächlich muß noch die Frage offen gelassen werden, ob nicht doch ein besonderer Bakteriophage der ganzen Erscheinung zugrunde liegt.

Pesch ist geneigt, das Auftreten der Löcher dadurch zu erklären, daß sich im gleichmäßigen Bakterienrasen eine durchsichtiger wachsende Variante abspaltet, welche sich stärker vermehrt und die undurchsichtige Ausgangsform verdrängt. Es würden also die Löcher „gewissermaßen Kolonien der durchsichtigen Variante im undurchsichtigen Unter-



Fig. 1.

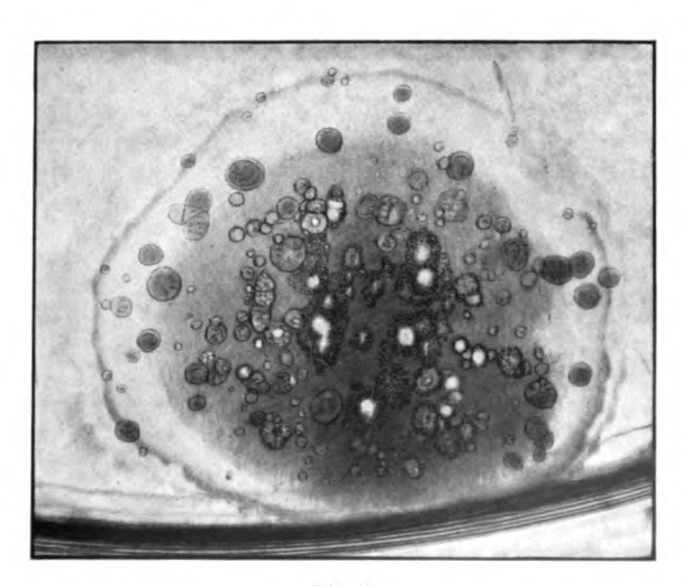


Fig. 2.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

grunde des Kulturrasens" sein. Für die eigenen Beobachtungen trifft diese Erklärung schwerlich zu; denn man sieht nichts von einer Verdrängung des ursprünglichen Kulturrasens und die sekundäre Kolonie müßte sich bei aller Durchsichtigkeit doch irgendwie als solche verraten. Es liegt vielmehr zweifellos ein Verlust an Masse, eine Auflösung schon gebildeter Substanz vor, vielleicht vorangegangen vor einer Art Hypertrophie, mit der die knopfartige Auflagerung verglichen werden könnte. Impft man von den Knöpfen ab, noch ehe sie sich zu Löchern umgewandelt haben, so erhält man wieder das beschriebene Wachstum.

Es ist sehr wahrscheinlich, daß die erhöhte Temperatur von 42° auf das Auftreten von Löchern Einfluß hat. Wie erwähnt, treten die Löcher auf Schiefagar schön auf, wenn man die Abimpfung zunächst 24 Std. bei 37° hält und dann bei Zimmertemperatur läßt. Das Auftreten von Löchern wird aber beschleunigt, wenn man nach dem Aufenthalt bei 37° noch einen 20stdig. bei 42° einschiebt. Die Abimpfungen unmittelbar in 42° zu bringen, ging nicht an, weil dabei wohl in Brühe, nicht oder nur sehr dürftig auf Agar ein Wachstum erfolgt.

Weiter ergab sich, daß alle aus dem virulenten, nicht lochbildenden Stamme bei 42° zu anderen Zwecken hergestellten, abgeschwächten Kulturen (im ganzen 7) unter den angegebenen Bedingungen durchlöchertes Wachstum zeigten. Schließlich wurde im direkten Versuche von der virulenten Kultur eine Brüheabimpfung 3 Tage bei 42° gehalten, hierauf auf Schrägagar ausgestrichen. Dieser blieb 20 Std. bei 37° und ergab lochfreies Wachstum; nach weiterem Aufenthalte bei Zimmertemperatur entstanden aber nach einigen Tagen Löcher, die bei nicht erhitzten Kontrollabimpfungen ausblieben. Für den benützten Milzbrandstamm kann also die Temperatur als Veranlassungsursache der eigentümlichen, bakteriophagenähnlichen Erscheinung betrachtet werden.

Die Erschliessung des Zellbildes bösartiger Geschwülste. Ueber artfremde Zellen im Krebs.

[Aus dem Preuß. Institut für Infektionskrankheiten „Robert Koch", Abteilung Prof. Dr. Jos. Koch, Berlin.]

I. Mitteilung.

Von Prof. Dr. **Jos. Koch.**

Mit 3 Tafeln.

Daß die Krebsgeschwulst als eine durch schrankenlose Wucherung von Körperzellen entstandene Neubildung aufzufassen ist, darüber herrscht heute allgemeine Uebereinstimmung. Aber nicht das Bindegewebe, wie R. Virchow annahm, sondern die Epithel- und Epidermoidalzellen sind der Ausgangspunkt der Krebswucherung. Auf diese Tatsache gründet sich die Mehrzahl der Hypothesen, die über die Ursache und die Entstehung des Krebses aufgestellt sind.

Die Cohnheimsche Theorie läßt embryonale Zellen, die bei der Bildung der Körpergewebe aus ihrem Verband geraten und versprengt worden sind, durch

irgendeinen unbekannten Reiz die Fähigkeit gewinnen, zu wachsen, sich zu vermehren und unbeschränkt zu wuchern. Eine Erweiterung dieser Theorie ist die Ribbertsche, nach der nicht nur embryonale, sondern beliebige, durch irgendwelche entzündliche Prozesse aus ihrer Umgebung losgelöste Epithelzellen die Fähigkeit zum unbeschränkten und unaufhaltsamen Wachstum erlangen, so daß sie zunächst eine lokale Geschwulst bilden, dann in die Lymph- und Blutgefäße einbrechen und endlich in den verschiedensten Organen Metastasen bilden. Die Theorie v. Hansemanns vertritt die Auffassung, daß die Epithelzelle sich ändere, sich entdifferenziere, d. h. in eine Art embryonalen Zustandes übergehe, wodurch sie ihre spezifischen Eigenschaften verliere und schrankenlos zu wuchern beginne. Den Zustand der Zellveränderung bezeichnet v. Hansemann mit dem Ausdruck Anaplasie, womit er lediglich den veränderten Zustand der Zelle kennzeichnen, keineswegs aber etwas über die Ursache des ungehemmten Wachstums der Krebszellen aussagen will.

Die wirkliche Ursache, die den Anstoß zur epithelialen Wucherung gibt, erklären jedoch alle diese Hypothesen von der spontanen zellulären Entstehung des Krebses nicht, und man kann v. Leyden, einem überzeugten Anhänger der parasitären Theorie, nur zustimmen, wenn er behauptet, daß nur diese imstande sei, die Entstehung, Entwicklung und Uebertragung der malignen Geschwülste verständlich zu machen. Seine Ansicht in dieser Frage spricht er mit folgenden Worten aus (Ztschr. f. Krebsforsch. Bd. 1. 1904. S. 298):

„Wir erkennen es als eine durch die anatomisch-histologischen Forschungen festgestellte Tatsache an, daß die Zellen, die (alleinigen oder hauptsächlichsten?) Träger der Fortpflanzung und eventuell Uebertragung von malignen Tumoren sind. Allein wir können es uns nicht vorstellen, daß normale Körperzellen an sich auch die malignen Eigenschaften des Karzinoms annehmen können, daß vielmehr diese Umwandlung in den Eigenschaften der Zellen nur durch die innerhalb der Zellen gelegenen und wachsenden Parasiten begreiflich wird.“

Diese Ansicht v. Leydens ist einleuchtend; sie hat sehr viel Wahrscheinlichkeit für sich. Auch ich sehe die Ursache der Epithelvermehrung nicht in einer spontanen Zellwucherung, sondern in einem Reiz, der die Epithelzellen zum Wachstum und zur Vermehrung bringt. Für die Annahme, daß dieser Reiz ein exogener, d. h. ein parasitärer ist, sprechen wichtige Tatsachen. Die Theorie der parasitären Entstehung erklärt das Wesen des Krebses am umfassendsten und am ungezwungensten.

Die Frage der parasitären Entstehung ist ja sehr alt. Immer und immer wieder ist die Lösung dieses Problems versucht und nach dem Krebsparasiten gesucht worden. Aber alle angeblichen Krebserreger haben vor der Kritik nicht bestehen können. Heute hat die Krebsfrage die Medizin in 2 Lager gespalten; in dem einen stehen bedeutende Vertreter der pathologischen Anatomie von der spontanen zellulären Entstehung; sie haben die Anhänger der parasitären äußeren Ursache des Krebses in die Verteidigung gedrängt; enttäuscht über die vielen Mißerfolge der ätiologischen Forschung, sind wohl die meisten Mediziner in das Lager der Vertreter der pathologischen Anatomie übergegangen.

Es gehört also schon ein gewisser Mut dazu, die Frage der Krebsätiologie wieder aufzunehmen und sich damit der Gefahr auszusetzen, sich mit einem Gegenstande zu beschäftigen, an dem schon so viele Forscher gescheitert sind. Aber nichts wäre verkehrter, als in einer so wichtigen Angelegenheit die Hände müßig in den Schoß zu legen, auf weitere Forschungen in der Krebsfrage von vornherein zu verzichten oder sich mit apodiktischen Urteilen über die Aussichtslosigkeit der ätiologischen Forschung zu begnügen. Auch der kleinste Fortschritt in der Erkenntnis des Wesens des Krebses ist immer noch mehr wert, als die kühnsten Hypothesen oder vorschnelle Urteile. Auch heute noch trifft zu, was R. Virchow in der Einleitung seiner 1. Arbeit „Zur

Entwicklungsgeschichte des Krebses“ im Jahre 1847 geschrieben hat (s. Virchows Archiv. Bd. I. S. 95):

„Die Bedingungen der Entstehung, des Wachstums und des Unterganges des Krebses gehören zu den höchsten Fragen, welche die medizinische Praxis an die medizinische Wissenschaft stellen kann, und es könnte verwegen erscheinen, ihre Lösung jetzt auch nur versuchen zu wollen. Forschen wir zunächst nach den Gesetzen der Erscheinung; erst nachdem diese erkannt sind, darf der Geist die größere Forschung nach dem Grunde der Erscheinung beginnen.“

Das aber darf wohl ohne Widerspruch gesagt werden, daß die Krebsfrage ein Zellenproblem ist. Alle noch so geistreich ersonnenen Hypothesen und Erklärungen über die Entstehung des Krebses schaffen die Tatsache nicht aus der Welt, daß eine menschliche Zelle plötzlich parasitäre Eigenschaften annimmt und zu wuchern anfängt, und daß keine Hypothese bisher erklären konnte, woher die Epithelien plötzlich die parasitären Eigenschaften erhalten. Die ätiologische Forschung muß daher vom Studium der Zellen des Krebses ausgehen. Das ist zwar schon früher geschehen; wenn man aber hier nicht weiter gekommen ist, so lag es in der Hauptsache wohl daran, daß die Methoden der Zellforschung damals, als diese Dinge studiert wurden, noch zu unvollkommen waren und nicht ausreichten, unsere Kenntnisse über die Krebszellen erheblich zu fördern; denn mit der hauptsächlich von der pathologischen Anatomie bevorzugten Methode des Zellstudiums am gehärteten und gefärbten Schnittpräparat war das nicht möglich. Vorbedingung für ein erfolgreiches Studium der Krebszellen sind Methoden, welche die einzelnen Zellformen möglichst wenig schädigen, sie in ihrer ursprünglichen Gestalt erhalten, die einzelnen Zellbestandteile klar und deutlich erkennen lassen und so ein vergleichendes Studium der isolierten normalen und pathologischen Zellen gestatten.

Ueber Untersuchungsmethoden von Geschwulstzellen im allgemeinen.

In einfachster und übersichlichster Weise sind Zellen durch eine Vitalfärbung dem Auge sichtbar zu machen. Kann man dem fixierten Ausstrichpräparat den Vorwurf machen, daß es die tatsächlichen Verhältnisse nicht genau wiedergibt, daß manche charakteristischen Eigentümlichkeiten der Zellen durch die schrumpfende Wirkung der Fixierungsflüssigkeiten stark verändert werden, so fallen diese Bedenken bei einer Vitalfärbung fort. Daher ist sie für das Studium mancher zarten und überaus hinfälligen Geschwulstzellen von größter Bedeutung und wird von keiner Methode der Darstellung an Güte und Zuverlässigkeit übertroffen; ja, auf Grund meiner Erfahrungen möchte ich behaupten, daß wir erst mit der Einführung einer zuverlässigen Vitalfärbung imstande sind, das Zellstudium der bösartigen Geschwülste erfolgreich zu betreiben. Aber nicht jede Vitalfärbung eignet sich zur Aufschließung des Zellbildes. Am besten hat sich mir die Färbung mit dem Methylgrün-Pyroningemisch nach Pappenheim bewährt. Ich habe sie zur vitalen Färbung von Geschwulstzellen wohl zum ersten Male systematisch angewendet. Ihre Vorzüge sind im folgenden begründet: sie ist eine Doppelfärbung, ähnlich wie die Romanowsky- oder Giemsa-Färbung. Man durfte daher erwarten, daß die verschiedenen Zell-

bestandteile sich elektiv färbten und schon allein dadurch voneinander unterscheiden ließen. Praktische Versuche haben diese Annahme bestätigt. Das ist aber nicht ihr einziger Vorzug, fast ebenso wichtig ist, daß sie so gut wie gar nicht überfärbt und endlich, daß sie bei der gleich zu schildernden Technik übereinstimmende und konstante Resultate gibt.

Der erste Eindruck, den ein mit dem Methylgrün-Pyroningemisch vital gefärbtes Präparat mit der Fülle der verschiedenen Zellen und zelligen Gebilde auf das Auge des Beobachters macht, ist zunächst ein verwirrender, die Deutung der einzelnen Bilder schwierig. Nach dem verhältnismäßig regelmäßigen und einfachen Bilde, das das Schnittpräparat zeigt, ist man erstaunt über die Mannigfaltigkeit der Formen, von denen ein Schnittpräparat nichts ahnen läßt. Offenbar ändert die Fixierung und Härtung des Tumormaterials viele zarte Zellgebilde so stark, daß ihre wirkliche Gestalt verloren geht, und ihre charakteristischen Einzelheiten sie nicht genügend unter den übrigen Zellen hervortreten läßt. Daher ist das Studium der Zellen eines Tumors nur am gehärteten Schnittmaterial unbefriedigend, unvollkommen und führt leicht zu falschen Schlußfolgerungen.

Mittels obiger Vitalfärbung sind wir imstande, die in einer bösartigen Geschwulst vorkommenden Zellformen zu bestimmen und sie voneinander abzugrenzen. Wir können sie ebenso bestimmen, wie die Zellen des Blutes; wir sind imstande, eine „Cytologie des Krebses“ zu schaffen und in die „Zellanarchie“ des Krebses (ein Wort, das den Stand unserer Kenntnisse oder besser gesagt, Unkenntnisse auf diesem Gebiete treffend kennzeichnet) Ordnung zu bringen. Damit ist die Krebsforschung auf eine breite sichere Basis gestellt und ein erfolgreiches systematisches Arbeiten gewährleistet.

Eine wertvolle Ergänzung erfährt die Vitalfärbung durch das Studium lebendfrisch fixierter Ausstrichpräparate. Der Krebssaft oder die Krebsmilch wird auf Deckgläschen oder Objektträgern ausgestrichen und in noch näher zu schildernder Weise fixiert und gefärbt.

Erst an 3. Stelle kommt für das Studium der Geschwulstzellen die Untersuchung gefärbter Schnittpräparate in Frage, eine Methode, die zur Diagnose des Karzinoms fast ausschließlich angewendet wird. Für die topographische Histologie der Geschwulstzellen ist sie allerdings die souveräne Methode; für das Studium der einzelnen Zellen reicht sie in keiner Weise aus. Dafür bedarf es der gemeinsamen Anwendung der Vitalfärbung, der Untersuchung des fixierten Ausstriches und des gehärteten Schnittpräparates, einer Methodik, wie ich sie systematisch durchgeführt habe.

Technische Bemerkungen.

Für ein erfolgreiches Arbeiten ist notwendig:

1. Daß das Tumormaterial möglichst lebendfrisch verarbeitet wird. Das gilt nicht nur für die Vitalfärbung, das fixierte Ausstrichpräparat, sondern auch für das Schnittmaterial.

Allerdings läßt sich diese Forderung nicht immer erfüllen. Auch bei meinem Material war die Verarbeitung erst mehrere Stunden post operationem möglich, ein Zeitraum, der durch das Abholen des Materials von der chirurgischen Station entstand.

Zweckmäßigerweise wird man die technischen Vorarbeiten an der Stelle ausführen, an der das Material sofort aus der Hand des Chirurgen in Empfang genommen werden kann.

2. Die zu fixierenden Ausstrichpräparate müssen möglichst rasch hergestellt werden. Es darf nicht vorkommen, daß die Ausstriche antrocknen; sie müssen vielmehr wie Protozoenpräparate stets feucht fixiert und stets feucht weiter behandelt werden.

Zur Einarbeitung empfehle ich zunächst Tumoren mit geringer Stromaentwicklung, also zellreiche Krebse zu verwenden.

Von den verschiedenen Zelltypen fertigt man zweckmäßig eine farbige Zeichnung an. So verschafft man sich bald ein Anschauungsmaterial, das ein vergleichendes Studium der Zellformen bösartiger Tumoren jederzeit gestattet und den Ueberblick wesentlich erleichtert.

Die systematische Untersuchung der Zellen eines bösartigen Tumors setzt sich aus folgenden 3 Akten zusammen:

1. Die Untersuchung der mit dem Pyronin-Methylgrüngemisch nach Pappenheim vital gefärbten Zellen im hängenden Tropfen.

Als Farbgemisch (Pappenheim-Unna) brauche ich folgende Lösung:

Methylgrün 00	0,15	g
Pyronin	0,25	„
Alkohol	2,5	ccm
Glyzerin	20,0	„
0,5proz. Karbolwasser	100	„

Die Anwendung der Farblösung ist sehr einfach. Man hat nur nötig, einen Tropfen der unverdünnten Farbflüssigkeit auf ein Deckgläschen zu bringen und darin die Zellen, die man mit einer Messerklinge von einer beliebigen Stelle des Tumors durch Abstreichen sich verschaffen kann, aufzuschwemmen. Ich mache darauf aufmerksam, daß es die unverdünnte Farbflüssigkeit sein muß, und daß man stets so viel von der Lösung verwendet, daß die Zellen in ihr schwimmen können. Zur Herstellung eines guten Präparates genügt also nicht das Hinzufügen eines kleinen Farbstofftröpfchens, eine Methode, wie wir sie gewöhnlich bei der Vitalfärbung von Bakterien anwenden, sondern der Farbstoff tritt hier einfach an die Stelle der physiologischen Kochsalzlösung; dann wird das so beschickte Deckgläschen auf einen mit Fett umrandeten Objektträger gebracht und wie ein gewöhnlicher hängender Tropfen behandelt. Trotzdem die Farblösung dunkel und undurchsichtig zu sein scheint, ist sie an den Randpartien eines hängenden Tropfens noch durchsichtig genug, um jede einzelne Zelle scharf und deutlich erkennen zu lassen. Sie reißen den Farbstoff begierig an sich, so daß schon in wenigen Minuten das Optimum der Färbung erreicht ist.

Die Randpartien des Präparates sind die besten. Will man sämtliche Zellen eines Tropfens zur Anschauung bringen, so nimmt man nach genügender Einwirkung des Farbstoffes das Deckgläschen vom hohlgeschliffenen Objektträger ab, legt es auf einen flachen und übt einen leichten Druck auf dasselbe aus. Kleinere Epithelverbände können auf diese Weise der mikroskopischen Betrachtung einigermaßen zugänglich gemacht werden. Da aber gewöhnlich die im Innern eines Zellverbandes liegenden Zellen das Farbgemisch nur unvollkommen aufgenommen haben,

ist meistens eine Nachfärbung des Präparates durch Hinzufügen eines Tropfens Farblösung notwendig. Derartige Präparate von Paraffin oder Vaselin umrandet und luftdicht abgeschlossen, lassen sich sogar 24—48 Std. in feuchter Kammer ebenso wie die hängenden Tropfenpräparate aufheben, ohne daß die Geschwulstzellen erheblich verändert werden. Wichtig ist eben, sie vor Austrocknung zu schützen.

Ein derartig vital gefärbtes Präparat wird von 2 Farben beherrscht, von dem Blau des Methylgrüns und dem Rot des Pyronins. Das Blau tritt jedoch nicht immer in demselben Farbton auf, sondern es gibt Uebergänge vom Grün zum Dunkel- bis zum Graublau; ja manchmal ist dem Graublau noch ein bräunlicher Farbton beigemischt. Aehnlich verhält es sich mit dem Rot. Dunkelrot färben sich z. B. die Kernkörperchen, während das Protoplasma der Zellen meist ein Rosarot aufweist.

Der Einfachheit wegen bezeichne ich zunächst alles, was sich in seinen verschiedenen Farbtönen blau färbt, als Kerne, Kernchromatin oder Kernsubstanz; alles, was innerhalb der Epithelkerne, wie z. B. die Kernkörperchen, eine tiefrote Farbe annimmt, könnte man als Nukleolarsubstanz ansprechen. Diese Unterscheidung mache ich lediglich aus dem Grunde, um die Beschreibung der verschiedenen Zellen und Zellbestandteile praktisch zu vereinfachen. Ueber das Prinzip der Färbung wissen wir ja noch nichts Sicheres, ob man sie als eine mikrochemische Reaktion aufzufassen hat, oder ob sie auf physikalischer Grundlage beruht. Bei der Methylgrün-Pyroninfärbung dürfte es sich vielleicht um eine mikrochemische Reaktion handeln, weil diejenigen Kernbestandteile, in denen nach mikrochemischen Reaktionen Nuklein vertreten ist, sich mit saurer Lösung vom Methylgrün stark grün färben, weil ferner dieser Farbstoff nach Miescher mit Nukleinsäure unlösliche Salze bildet. Aus diesen Gründen hat man das Methylgrün für ein spezifisches Reagens auf Nuklein gehalten.

2. Das Studium des fixierten und gefärbten Ausstrichpräparates.

Die Technik seiner Herstellung weicht etwas von der üblichen ab, weshalb ich sie an dieser Stelle genauer schildern will.

Um das Zellbild einer bösartigen Geschwulst zu erschließen, ist es notwendig, die dort vorkommenden Zellen auf ein Deckgläschen oder einen Objektträger in möglichst feiner Schicht auszustreichen. Zu diesem Zweck wird zunächst durch den Tumor ein Schnitt geführt und dann mit einem scharfen Messer einmal kratzend über die frische Schnittfläche gefahren, wobei man das Heraustreten der Krebszellen aus den Alveolen noch durch Druck auf die Geschwulst unterstützen kann. So erhält man eine genügende Menge Krebsmilch auf die Messerklinge. Ein kleines Tröpfchen wird dann auf ein Deckgläschen oder einen Objektträger gebracht und mit der Kante eines zweiten Deckgläschens über die Oberfläche ausgestrichen. Ich schiebe den Tropfen aber nicht wie bei der Herstellung eines Blutpräparates mit der Kante des zweiten Deckgläschens über die Oberfläche von mir weg, sondern verteile ihn im entgegengesetzten Sinne über die Oberfläche.

Auf diese Weise wird ein Messerabstrich auf mehrere Deckgläschen verteilt. Ist er verarbeitet, so mache ich eine neue, der ersten parallele Schnittfläche durch den Tumor, über die ich ebenfalls mit der Messerklinge herüberfahre, so einen dritten, vierten usw., bis ein

Teil oder der ganze Tumor in Scheiben zerlegt ist. Es empfiehlt sich, von einer Geschwulst stets eine größere Anzahl, 30—40 Ausstrichpräparate anzufertigen, da der Zellreichtum und die Art der Zellen in demselben Tumor sehr verschieden sein kann. Je dünner und gleichmäßiger die Ausstriche vom Krebssaft ausfallen, desto schöner wird auch die Färbung; desto leichter ist das Zellstudium.

Mit der beschickten Seite läßt man die Deckgläschen auf die Fixierungsflüssigkeit fallen; Objektträger stellt man am besten in eine Farbwanne. Ich lasse die Ausstriche gewöhnlich 24 Std. fixieren. Fraglos wird bei dünnen Ausstrichen der Fixierungsprozeß in weit geringerer Zeit vollendet sein; aber da die Ausstriche selten in gleichmäßig dünner Schicht herzustellen sind, so trage ich diesem Umstande dadurch Rechnung, daß ich die Präparate durchweg 24 Std. in der Fixierungsflüssigkeit belasse; eine Schädigung der Präparate habe ich dabei nicht beobachtet.

Die weitere Behandlung der in Flemmingsche Lösung gebrachten Deckgläschen geschieht in folgender Weise: Nach der Fixierung Auswaschen über Nacht in fließendem Wasser, danach Härtung in 70proz. Alkohol.

In Sublimat fixierte Präparate werden für 24 Std. in Jodalkohol gebracht (60proz. Alkohol), dem so viel Jodtinktur zugesetzt wird, bis er eine braunrote Farbe hat) und dann in 60proz. Alkohol ausgewaschen, wobei der Alkohol mehreremals gewechselt wird; darauf Nachhärten in 70proz. Alkohol, in dem die Präparate bis zur Färbung aufgehoben werden können.

Zusammensetzung der Fixierungsflüssigkeiten.

1) Die Flemmingsche starke Lösung:
   2proz. Osmiumsäure 4 ccm } in brauner Glasflasche mit eingeschliffenem
   1 „ Chromsäure 15 „ } Stopfen aufzubewahren!
   Eisessig 1 „
2) Sublimatalkohol nach Schaudinn:
   2 Teile konz. wässerige Sublimatlösung (7 g in 100 ccm koch. dest. Wasser gelöst)
   1 Teil absoluter Alkohol.

Als Fixierungsflüssigkeit für Zellen halte ich die Flemmingsche Lösung dem Sublimatalkohol gegenüber für überlegen. Feinere Protoplasmastrukturen bleiben bei der ersteren besser erhalten. Damit soll aber nicht gesagt sein, daß ich den Sublimatalkohol als Fixierungsmittel für überflüssig halte. Im Gegenteil! Für die wichtige Methylgrün-Pyroninfärbung der Ausstrichpräparate kommt sie allein in Betracht. Um für spätere Färbungen freie Hand zu haben, pflege ich bei der Herstellung der Ausstrichpräparate stets beide Fixierungsflüssigkeiten zu verwenden, indem ich die eine Hälfte der Ausstriche in Flemming, die andere Hälfte in Sublimatalkohol bringe.

Der Ausfall der Färbung ist nicht immer der gleiche. Während der eine Tumor schön gefärbte Zellen liefert, sind sie bei einem anderen oft unscheinbar gefärbt. Das ist in der Hauptsache darauf zurückzuführen, daß in dem einen Fall die Zellwucherung noch frisch, während in einem anderen Falle viele Zellen schon im Stadium der Degeneration sich befinden. Das beeinträchtigt natürlich nicht unerheblich ihre Färbbarkeit.

An sonstigen Flüssigkeiten werden gebraucht:

Jodalkohol 60proz. (Jodzusatz bis zur hellbraunen Färbung),
Alkohol 60—70—80—96—100proz. (absoluter Alkohol),
Xylol,
Kanadabalsam.

Für das in Flemmingscher Lösung fixierte Ausstrich- und Schnittpräparat kommt als Färbung in Betracht: Safranin-Lichtgrün.

Sie ist besonders für Drüsenkrebse des menschlichen Organismus zu empfehlen, für Präparate des Frankfurter Mäusetumors eignet sie sich weniger gut. Die Färbung fällt oft ungleichmäßig aus; ist sie aber gelungen, so gibt sie gute Bilder. Der Ausfall hängt in der Hauptsache vom Zellreichtum des Gewebes und von der Frische der Zellwucherung ab. Junges, noch nicht degeneriertes Epithelgewebe und Zellen binden das Safranin fester als in regressiver Metamorphose befindliches Tumorgewebe. Während das Bindegewebe den Farbstoff leicht abgibt, halten die zellreichen Teile ihn desto fester; genaue Zeitangaben über die Dauer der Differenzierung lassen sich nur schwer machen. Man muß sie eben von Fall zu Fall ausprobieren.

Unter Berücksichtigung dieser Momente kann ich im allgemeinen folgendes Verfahren der Safranin-Lichtgrünfärbung empfehlen:

1) Färbung von Ausstrich- und Schnittpräparaten 24 Std. in konzentr. wässeriger Safranin-O-Lösung (Grübler, Leipzig).

2) Abspülen in Wasser, Differenzierung und Gegenfärbung in einer Lichtgrün-F.S.-Lösung (Grübler, Leipzig), 1 ccm konzentr. alkoholische Lichtgrünlösung + 9 ccm Aq. dest.

3) Abspülen in 70proz. Alkohol, event. nochmalige Gegenfärbung in Lichtgrün, bis das Präparat dauernd einen grünen Schimmer hat.

4) Aufsteigende Alkoholreihe,
Xylol,
Zedernöl.

Jollos (Arch. f. Protistenk. Bd. 37. 1917: Untersuchungen zur Morphologie der Amöbenteilung), der mit Safranin-Lichtgrün zuerst Amöben gefärbt hat, beschreibt sein Verfahren in folgender Weise:

„Am besten bringt man die fixierten und in Alkohol gehärteten Präparate auf 24 Std. in eine konzentrierte wässerige Lösung von Safranin (Safranin O. Grübler oder eine andere bewährte Marke), spült dann die Farbe in 30proz. Alkohol ab und bringt das Präparat durch die Alkoholreihe in eine konzentrierte Lösung von Lichtgrün in 96proz. oder absolutem Alkohol, in der es je nach dem Objekt $^1/_4$—8 Min., event. auch länger verbleibt. Sind Zeiten und Lösungen für ein Objekt einmal ausprobiert, so kann man fast ohne Differenzierung unter dem Mikroskope auskommen! Die Methode ergibt, wie wohl die Abbildungen dartun, sehr scharfe und klare kontrastreiche Bilder.“

Auch Karbolthionin kann zur Färbung von Flemming-Präparaten verwendet werden:

1proz. Karbolwasser	100 ccm
gesättigte Lösung von Thionin in 50proz. Alkohol	10 „

Ausstriche und Schnitte werden 24 Std. gefärbt, in Wasser abgespült und in 70proz. Alkohol differenziert, Alkoholreihe, Xylol, Kanadabalsam.

Sublimatpräparate werden 24 Std. mit dem Methylgrün-Pyroningemisch (Zusammensetzung s. o.) gefärbt. Um eine konstante gleichmäßige Färbung zu erzielen, lasse ich durchweg die Präparate über Nacht in der Farbflüssigkeit. Dann hat sich der Farbstoff mit den einzelnen Zellbestandteilen derart verankert, daß beim Differenzieren und Durchführen des Präparates durch die Alkoholreihe genügend Farbstoff im Präparat zurückbleibt. Den Färbeprozeß bei der Methyl-

grün-Pyroninfärbung abzukürzen, möchte ich widerraten. Nach der Färbung werden die Präparate kurz in Wasser abgespült, in 70proz. Alkohol differenziert, weiter schnell durch die Alkoholreihe geführt, entwässert, Xylol, Kanadabalsam.

3. Untersuchung des Schnittmaterials.

Fixierungs- und Härtungsflüssigkeiten: dieselben wie für die Behandlung und Färbung der Ausstrichpräparate.

Außer der Safranin-Lichtgrün-, der Methylgrün-Pyroninfärbung empfehle ich für Schnittmaterial die wichtige Hämatoxylin (Delafield)-mit Pikrinsäure-Gegenfärbung.

Das Hämatoxylin (Delafield) bereite ich in folgender Weise:
40 g Ammoniakalaun,
400 ccm Wasser,
dazu so viel konz. alkohol. Hämatoxylinlösung (10 g Hämatoxylin crist., 90 ccm Alkohol), bis das Ganze eine schöne blaue Farbe hat.

Die Lösung lasse ich im weiten offenen Becherglase im Lichte reifen. Sie ist gut, wenn sie bei 24stünd. Färbung nicht überfärbt, so daß eine Differenzierung der Schnitte nicht mehr notwendig ist. Die nach der Färbung in fließendem Wasser gut gewässerten Präparate werden mit dünner, wässeriger Pikrinsäure gefärbt, bis sie einen gelben Farbton haben. Die Färbung gibt sehr gute kontrastreiche Bilder.

Gegenfärbung ist auch möglich mit Ammoniakkarmin (Ammoniak, Karmin, Aq. dest., Glyzerin).

Weiter eignet sich für Schnitte die Hämatoxylinfärbung nach Heidenhain nach vorhergehender 24stünd. Beizung in einer Lösung von Eisenammonium (Aq. dest. 1000,0, Ferr. oxyd. ammoniat. 35,0). Die Hämatoxylinlösung gebrauche ich in folgender Zusammensetzung:

Hämatoxylin crist. (Grübler)	4,0
Alkohol abs.	40,0
Aq. dest.	360,0

In brauner Flasche aufzubewahren. Je älter die Lösung, um so besser färbt sie.

Der Gang der Beizung und Färbung gestaltet sich folgendermaßen:

1) Die auf die Objektträger aufgeklebten Schnitte kommen nacheinander in Xylol, Alkohol abs., 96—80-, 70—60proz. Alkohol;
2) 24 Std. in die Beize von Eisenammonium, nach der Beizung
3) kurzes Abspülen in dest. Wasser, von dort
4) 24 Std. in die Hämatoxylinlösung, darauf
5) kurzes Abspülen in frischem Leitungswasser,
6) Differenzieren in Eisenammoniumlösung,
7) Abspülen $1/4$ Std. lang in frischem Leitungswasser,
8) 70—80—96proz. absolut. Alkohol, Xylol, Kanadabalsam.

Als Kontrastfärbung empfehle ich die Gegenfärbung mit Eosin.

Für Sublimatpräparate kommt schließlich als einfache Färbung noch die mit Karbolthionin in Betracht.

Aus dem Zellenbild des menschlichen Krebses.

Das vital gefärbte Präparat.

Das Zellenbild einer Krebsgeschwulst setzt sich aus 3 verschiedenen Zellgruppen zusammen:

1. Aus den Epithel-,
2. Aus den Stroma-,
3. Aus besonderen, noch näher zu beschreibenden Zellen.

Die Bestimmung und Deutung dieser verschiedenen Zellen ist deshalb so schwierig, weil die Geschwulstzellen im allgemeinen bei

ihrem Wachstum und bei ihrer Vermehrung häufig veränderte Formen bilden. Pathologische Zellteilungsvorgänge und Kernbilder, z. B. der Krebsepithelien, sind schon lange bekannt. Mit den oben genannten Untersuchungsmethoden lassen sich unsere bisherigen Kenntnisse auf diesem Gebiete wesentlich erweitern, strittige Fragen noch weiter klären.

Bei der Bestimmung der Zellen und der Entscheidung der Frage „arteigene“ oder „artfremde“ Zellen ist ferner wohl zu berücksichtigen, daß das Methylgrün-Pyronin-Gemisch sowohl für das Chromatin der Metazoen- als auch das der Protozoenzellkerne dieselbe spezifische Affinität besitzt, genau so wie dies bei unseren gewöhnlichen Kernfarbstoffen der Fall ist.

Ausgangs- und Orientierungspunkt der Zellstudien muß die Epithelzelle sein. Es ist daher notwendig, zunächst das Bild der vitalgefärbten Zelle zu schildern. Sofern sie wohl erhalten und nicht degeneriert ist, zeigt sie gegenüber dem Pappenheimschen Farbgemisch ein durchaus regelmäßiges und elektives Verhalten. Die eine Komponente, das Methylgrün, reißt der Kern, also das Kernchromatin, das sich meist blaugrau färbt, an sich; die andere Komponente, die rote Farbe des Pyronins, nehmen dagegen die in Ein- oder Mehrzahl vorhandenen Kernkörperchen und das Zellprotoplasma auf. Die Nukleolen sind meist intensiv rot gefärbt, während das Protoplasma einen rötlichen oder rosaroten Farbenton annimmt.

Von den also gefärbten Epithelzellen läßt sich nun eine besondere Zellart ohne Schwierigkeit unterscheiden. Die einzelne Zelle zeichnet sich dadurch aus, daß sie einen blauen, meist blaugrünen Kern und ein helles, zuweilen glashelles hyalines, ungefärbtes, aber oft stark glänzendes Protoplasma hat, in dem Granula verteilt sein können. Zuweilen scheint es auch granuliert, oder mit der Andeutung eines vakuolären Baues. Ein Kernkörperchen ist im Kern nicht sichtbar. Es fehlt also in ihnen, im Gegensatz zu den Epithelzellen, die rote Farbe des Pyronins. Wegen des starken Farbunterschiedes des blauen Kernes mit dem hellweißen ungefärbten Zelleibe habe ich ihnen den Namen „blauweiße“ Zellen gegeben. In den folgenden Ausführungen werde ich diese Bezeichnung beibehalten, auch wenn es sich um die Darstellung und Beschreibung der Zellen im fixierten Ausstrich- und Schnittpräparat mit anderen Färbungen handelt.

Sie weisen noch andere bemerkenswerte Merkmale auf. Ihre Größe schwankt in sehr weiten Grenzen. Die kleinsten haben vielleicht den Umfang eines Kokkus, die größten Formen einen Durchmesser von etwa 12—15 μ. Dazwischen gibt es alle Uebergänge.

Weiter bedeutsam ist die wechselnde Gestalt, die auf die Fähigkeit amöboider Bewegungen zurückzuführen ist. An der Gestaltsveränderung nimmt auch der Kern teil. Durch diese aktive amöboide Beweglichkeit, die man natürlich am ungefärbten frischen Präparat studieren muß, ist die Mannigfaltigkeit der Gestalt der frischen Zellen zu erklären (s. photogr. Tafel I u. II).

Der Kern, gleichmäßig kompakt, rund oder oval, strukturlos ohne sichtbares Chromatingerüst ist gewöhnlich in der Einzahl vorhanden. Seltener trifft man außer dem Hauptkern noch 1 oder 2 kleinere Kernteile in dem hellen Zelleibe an. Der Mangel eines sichtbaren Kernkörperchens ist ein wichtiger Unterschied gegenüber der Epithelzelle, deren stark rot gefärbte Kernkörperchen sich scharf von dem blaugrauen Kernchromatin abheben.

Man begegnet zuweilen Zellen, die den beschriebenen durchaus ähnlich sind, die aber bei der Vitalfärbung einen Kern nicht mehr erkennen lassen, während ihre sonstige Struktur gut erhalten ist. Es sind das Formen der blauweißen Zellen, die ihren Kern verloren haben.

Die Zahl der in einem vital gefärbten Präparat anzutreffenden blauweißen Zellen ist sehr verschieden. Es scheint das von dem Zellreichtum der betreffenden Geschwulst abhängig zu sein. Gegenüber den Epithelzellen oder freien Kernen treten sie meist stark in den Hintergrund, so daß man sie suchen muß.

Es war wichtig, das Verhältnis der blauweißen Zellen zu den Epithelzellen festzustellen. Wenn im vital gefärbten Präparat ein Zellverband von Epithelien erhalten geblieben ist, trifft man die blauweißen Zellen zumeist vereinzelt zwischen den Epithelien. Zuweilen sieht man auch kleinere Verbände, wobei die einzelne Zelle stets gut von ihren Nachbarzellen zu unterscheiden ist. Wichtiger und beachtenswerter ist jedoch die Tatsache, daß sie auch innerhalb der Epithelzellen als intrazelluläre Gebilde vorkommen. Man sieht zuweilen Epithelien, in deren Zelleib eine blauweiße Zelle eingebettet liegt, die durch ihren verhältnismäßig großen blaugrünen Kern und ihr glashelles Protoplasma von dem blauen bis blaugrauen Kern und dem roten Protoplasma der Epithelzelle deutlich zu unterscheiden und abzugrenzen ist. Ja es kommt vor, daß 2, 3 blauweiße Zellen verschiedener Größe im Zelleibe einer Epithelzelle gelegen sind (s. Tafel II Nr. 13 u. 14 u. Tafel III Zeichn. 1—3).

Danach können wir die blauweißen Zellen nach ihrem Verhältnis und ihrer Lage zu den Epithelzellen unterscheiden: 1. in die frei vorkommenden, extrazellulären, deren Gestalt sehr mannigfaltig sein kann; 2. in die intrazellulären, im Protoplasma der Epithelzellen gelegenen.

Charakteristisch für die Einschlußzellen ist die durchweg kugelförmige oder ovale Gestalt, auch sind sie durchweg kleiner als die extrazellulären Formen.

Die blauweißen Zellen im Ausstrichpräparat.

Das Aufsuchen der blauweißen Zellen gelingt ohne besondere Schwierigkeit in sehr feinen, mit Krebssaft beschickten Deckglaspräparaten. In Flemming fixierte und mit Saffranin-Lichtgrün gefärbte Ausstriche zeigen das Besondere der Zellen am besten.

Aber auch die Färbung von Sublimatpräparaten mit Methylgrün-Pyronin darf nicht vernachlässigt werden; sie ist in jedem Falle notwendig.

Bei gelungener Safranin-Lichtgrünfärbung erscheint der meist runde, kompakte Kern der fraglichen Zellen gegenüber dem mehr Braunrot des Epithelkernes tiefrot, wie überhaupt ihre gute Kernfärbung selbst im zerfallenen Epithelgewebe etwas sehr Auffallendes ist. Der Zelleib erscheint wie ein graues Häutchen mit grünlichem Schimmer. Die größten Zellen lassen hier und da die Andeutung eines vakuolären Baues erkennen (s. Tafel III Zeichn. 4).

Außer dem zarten Protoplasma, das sich meist sehr wenig von dem Untergrund des Ausstriches abhebt, sind noch zwei weitere charakteristische Merkmale hervorzuheben: 1. die wechselnde Größe der Zellen, 2. die Lage des Kerns.

Dieser liegt entweder in der Mitte oder ist an den Rand der Zelle gerückt. Die Randständigkeit der Kernmasse ist oft so ausgesprochen, daß Kern und Zellrand teilweise zusammenfallen (s. Tafel I Nr. 5, 6). Kleineren Zellen sitzt der Kern dem Zelleibe zuweilen sichelförmig oder wie ein Kugelabschnitt auf (s. Tafel I Nr. 9). Bemerkenswert ist schließlich noch das starke Mißverhältnis zwischen dem großen Kern und dem gering entwickelten Protoplasma mancher Zellen (s. Tafel I Nr. 10). Sehr selten trifft man eine Zelle mit 2 Kernen; öfter sieht man aber außer dem Hauptkern noch Kernsubstanz in der Form kleiner Nebenkerne im Zelleib liegen. Besonders möchte ich darauf hinweisen, daß auch sehr kleine, den Umfang eines großen Kokkus nicht überschreitende Formen oft Kern und Zelleib deutlich erkennen lassen, der zuweilen wie ein sehr schmaler grauer Saum ersteren ganz oder teilweise umgibt.

Blauweiße Zellen, deren Protoplasma sich unregelmäßig eckig auf dem Deckglas ausgebreitet hat, können Epithelzellen manchmal recht ähnlich werden (s. Tafel I Nr. 7).

In mit Sublimatalkohol fixierten, mit Methylgrün-Pyronin gefärbten Ausstrichen tritt das feine graue Protoplasma gegenüber dem gleichmäßig blaugrün gefärbten Kern fast gänzlich in den Hintergrund. In erhaltenen kleinen Epithelverbänden mit zwischen und in den Epithelien befindlichen blauweißen Zellen sind die Kerne der letzteren durch ihren blaugrünen Farbenton meist leicht festzustellen. Dagegen ist das Protoplasma wegen seiner Unscheinbarkeit und schlechten Färbbarkeit entweder gar nicht, oder nur unvollkommen von der Umgebung abzugrenzen. Das ist auch der Grund, weshalb die Zellen so leicht übersehen werden, und ihr zelliger Charakter besonders in Gewebsschnitten bisher verkannt worden ist.

Das Schnittpräparat.

Zum Nachweis der Einschlußzellen im gefärbten Schnittpräparat können die gewöhnlichen Kernfarbstoffe wie Hämatoxylin, Safranin, Karbolthionin, die Heidenhainsche Färbung usw. verwendet werden. Der Kern der Einschlußzellen nimmt den Farbstoff bei lebendfrisch gehärtetem Gewebsmaterial ebenso gut auf, wie der Kern noch erhaltener und noch nicht degenerierter Epithelzellen. Aber auch hier zeigen sich Doppelfärbungen, wie die mit Methylgrün-Pyronin, mit Safranin-Lichtgrün, Hämatoxylin (Delafield)-Pikrinsäure oder Ammoniakkarmin-Gegenfärbung den einfachen überlegen. Mit den Doppelfärbungen gelingt es auch meist, wenn auch sehr unvollkommen, das Protoplasma der Einschlußzellen sichtbar zu machen. Immerhin bleiben auch mit den besten Färbungen noch eine Reihe der kleinsten, noch nicht differenzierten Einschlüsse der Epithelzellen ungefärbt.

Darf man die blauweißen Zellen als einen regelmäßigen und spezifischen Befund des Karzinoms ansprechen?

Mit der Vitalfärbung sind wir lediglich imstande, ihr Dasein nachzuweisen. Ueber die Zahl und Verteilung im Krebsgewebe gibt jedoch das Schnittpräparat den besten Aufschluß. Mit Hilfe desselben sind wir in der Lage, uns ein genaueres Bild über das Verhältnis der intrazellulären Formen zu den Epithelzellen zu machen. Für den Nachweis der freien Zellen kommt das Schnittpräparat beim menschlichen Krebs weniger in Betracht, da es oft schwer ist, sie wegen ihres wenig charakteristischen Aussehens von den anderen Gewebszellen und zerfallenen

zelligen Produkten zu unterscheiden. Bei den intrazellulären Einschlußzellen fallen diese Schwierigkeiten fort, da der Ort ihres Vorkommens bekannt ist.

Ich habe die blauweißen Zellen mit der Vitalfärbung und den anderen Methoden bisher in jedem Falle von Drüsen- oder zellreichem Krebs nachweisen können; also in Mamma-, Magen-, Rectum-, Cervixkrebsen; auch in Lymphdrüsen- und Lebermetastasen. Sie kommen in ulzerierten und nicht ulzerierten Karzinomen in gleicher Weise vor. Jedoch macht sich in entzündeten ulzerierten Krebsen das Vorhandensein von polynukleären Leukozyten bei der Untersuchung störend bemerkbar. Diese geben übrigens die gleiche vitale Farbenreaktion wie die blauweißen Zellen, sind aber durch ihren charakteristischen dreiteiligen Kern nicht mit den blauweißen Zellen zu verwechseln.

Die Frage, ob die blauweißen Zellen auch regelmäßig in Plattenepithelkrebsen zu finden sind, muß ich offen lassen, da ich bisher nur vereinzelte Fälle, diese allerdings stets mit positivem Resultat, untersuchen konnte. Ihr Vorkommen scheint mir aber ein spärliches zu sein.

Schnittpräparate durch Drüsenkrebse gewähren oft einen überraschenden Anblick. Einige nicht ulzerierte Mamma- sowie drei Rectumkarzinome zeigten die Einschlußzellen so zahlreich, daß fast keine Epithelzelle von ihnen frei erschien. Zahlreich fanden sie sich auch in einem malignen Rectumpolyp. Dagegen bargen die Zellen normaler Drüsenschläuche niemals die Einschlußzellen. Sie traten vielmehr stets dort auf, wo eine pathologische Wucherung, z. B. der Darmepithelien, im Gange war. In einigen Fällen von Brustdrüsen- sowie in mehreren Fällen von Mastdarmkrebs war die Mehrzahl der Einschlußzellen von mittlerer Größe; ihr Protoplasma hatte sich mit Lichtgrün gut gefärbt und hob sich scharf gegen den mit Safranin tiefrot gefärbten, meist randständig gelegenen Kern ab (s. Tafel II Nr. 15, und Tafel III Zeichnung Nr. 4 u. 5). Wie ein Vogel im Nest, so saßen diese eigenartigen Zellen im Protoplasma der Epithelien, deren großer Kern mit seinem Chromatingerüst ohne weiteres von den Einschlußzellen abzugrenzen war. In einem anderen Falle von Rectum- und bei einem Cervixkrebs war die Zahl der Einschlußzellen zwar noch größer, aber die einzelnen Formen durchschnittlich viel kleiner, so daß man an einzelnen Stellen den Eindruck hatte, als seien die Darmepithelien mit Kokken verschiedener Größe übersät. Manche waren so winzig, daß sie an der Grenze der Sichtbarkeit standen.

Zusammenfassend kann ich auf Grund meiner bisherigen Untersuchungen von etwa 100 verschiedenen Karzinomen sagen, daß die intra- und extrazellulären blauweißen Zellen zwar in jedem Falle, besonders aber in Drüsen- und zellreichem Krebs anzutreffen sind, daß aber ihre Zahl und ihre durchschnittliche Größe in den einzelnen Tumoren sehr wechseln kann.

Wie geraten diese Zellen in das Epithelgewebe?

Als der eigentliche Aufenthaltsort der blauweißen Zellen ist in Drüsenkrebsen wohl das Protoplasma der Epithelzellen anzusehen. Eine Aufnahme durch eine Art Phagozytose der letzteren kommt nicht in Frage; denn nach meinen Beobachtungen „fressen" Epithelzellen nicht; wohl aber können amöboide Zellen, wie z. B. polynukleäre Leukozyten, in ihren Zelleib eindringen. Das kann man in ulzerierten und entzündlich veränderten Krebsen hier und da beobachten. Nach den mikro-

skopischen Befunden halte ich aber auch ein aktives Einwandern der aus Kern und Protoplasma bestehenden, also wohldifferenzierten blauweißen Zellen für kaum möglich. Es ist dagegen wahrscheinlicher, daß eine Einwanderung in einem früheren Stadium stattfindet und die Einschlußzelle im Protoplasma der Epithelzelle allmählich heranwächst.

Dafür spricht der Umstand, daß

1. in den Epithelzellen Uebergänge von den kleinsten bis zu Formen etwa von der halben Größe eines roten Blutkörperchens und darüber zu beobachten sind; — 2. daß die großen extrazellulären Formen im Zelleib der Epithelzelle kaum genügenden Raum haben würden; — 3. jenes Verhältnis von Einschlußzelle zum Epithelkern, in dem dieser durch erstere verdrängt und eingedellt erscheint, ein Bild, das wohl nur durch ein in der Zelle heranwachsendes Gebilde erfolgt sein kann (s. Tafel III Zeichn. Nr. 1—3; vgl. auch Steinhaus, Virch. Arch. Bd. 126. Tafel XVIII u. XIX).

Welche Wirkung übt die Einschlußzelle auf die Epithelzelle aus? Daß sie auf manche Epithelzellen reizend wirken müssen, darf man wohl daraus schließen, daß nicht nur der Kern, sondern die ganze Wirtszelle sich vergrößern kann, also gewissermaßen hypertrophiert. Unter dem Einfluß der wachsenden parasitierenden Einschlußzelle gehen dann die Wirtszellen zugrunde. Auf welche Art und Weise das geschieht, konnte ich nicht feststellen. Wo die Wirtszellen zugrunde gegangen sind, werden die intrazellulären Einschlußzellen frei. Man sieht sie dann zuweilen in kleinerer oder größerer Zahl im Innern einer Krebsalveole, am ehesten noch an ihrem dunklen Kern vom noch erhaltenen Epithel unterscheidbar liegen. Im allgemeinen kann man sagen, daß die Zahl der blauweißen Zellen mit der Größe der Degenerationsbezirke parallel geht.

Ob übrigens alle extrazellulären blauweißen Zellen auf diese Weise entstehen, also zunächst ein intrazelluläres Stadium durchmachen müssen und nur unter Zerstörung der Wirtszelle zu extrazellulären Formen werden, lasse ich vorläufig dahingestellt.

Die blauweißen Zellen sind übrigens nicht imstande, ein zusammenhängendes Gewebe wie die Epithel- und Bindegewebszellen des menschlichen Organismus zu bilden. Jede Zelle bleibt ein isoliertes, für sich bestehendes Gebilde.

Die Lebensdauer derartiger freigewordener Einschlußzellen scheint eine kurze zu sein. Sie degenerieren sehr bald, vielleicht aus dem Grunde, weil sie auf eine Symbiose mit den Epithelien angewiesen sind. Wo z. B. eine größere Zahl von freigewordenen blauweißen Zellen inmitten eines Krebszapfens zugrunde gegangen ist, können Bezirke scheinbar hyaliner Degeneration entstehen, die hier und da noch erhaltene Zellen oder Kernreste der blauweißen Zellen einschließen können (s. Taf. I Nr. 1 und 2). Daß die blauweißen Zellen sehr hinfällige Gebilde sein müssen, beweist auch die Tatsache, daß sie nur in lebendfrisch fixiertem Gewebe in ihrer natürlichen Gestalt nachweisbar sind, während bei späterer Konservierung des Gewebsmaterials von ihrer charakteristischen Form kaum noch etwas zu entdecken ist.

Um das Zellstudium des menschlichen Krebses nicht zu erschweren, habe ich von der Aufzählung und Beschreibung anderer Zellformen zunächst abgesehen, denen wir in den einzelnen Teilen einer Krebsgeschwulst zu begegnen pflegen. Ich habe mich im vorhergehenden auf die Darstellung einer Zellart beschränkt, die mir als die wichtigste er-

schien, und die zu den die Hauptmasse der Geschwulst bildenden Epithelien in der engsten Beziehung steht. Mit der von mir angegebenen Technik läßt sich über sie folgendes feststellen:

Im Epithelgewebe des menschlichen Krebses kommen besondere Zellen vor, die sich morphologisch und biologisch anders wie die typischen Epithelzellen verhalten. So schwierig der Nachweis und die Unterscheidung der fraglichen Zellen von den Epithelzellen im gefärbten Schnittpräparat ist, so einfach gelingt er an der frischen Zelle durch die Vitalfärbung mit dem Methylgrün-Pyroningemisch. Beide Zellarten reagieren diesem gegenüber stets in typischer, aber doch verschiedener Weise. Bei der Gegenüberstellung und dem Vergleich beider Zellarten sehen wir folgendes Bild:

1. Während der Kern der Epithelien sich blaugrau, die in ihm stets vorhandenen Kernkörperchen lebhaft rot, das Protoplasma hell- oder rosarot färbt, nimmt der Kern der anderen Zellart eine blaue, meist blaugrüne Farbe an.

Ihr helles, zartes Protoplasma, das entweder von homogener Beschaffenheit oder zart granuliert ist, bleibt ungefärbt. Die rote Farbe des Pyronins kommt in diesen Zellen nicht vor, da ihr Kern keine Nukleolarsubstanz in der Form eines Kernkörperchens enthält. Der blaugrüne, kompakte Kern, häufig exzentrisch gelegen, der helle weiße, ungefärbte Zelleib, bilden einen starken Kontrast. Daher ist für sie die Bezeichnung „blauweiße Zelle“ sehr passend. Als solche sind sie unter den übrigen Zellen eines vital gefärbten Präparates leicht herauszufinden.

2. Als ein weiterer wichtiger Unterschied gegenüber der Epithelzelle sind die Größenverhältnisse der blauweißen Zelle hervorzuheben. Die Epithelzellen eines Krebses haben im allgemeinen eine gewisse Durchschnittsgröße. So gewaltige Schwankungen wie bei den blauweißen Zellen werden im allgemeinen bei ihnen nicht beobachtet. Bei diesen werden alle Uebergänge von Kokkengröße bis zu der einer hypertrophischen Epithelzelle angetroffen.

3. Von größter Bedeutung für die Charakteristik und Klassifizierung der blauweißen Zelle ist ihr Verhältnis zur Epithelzelle. Ihr eigentlicher Aufenthaltsort ist das Epithelgewebe und die Epithelzelle selbst, in deren Zelleib sie in Ein- oder Mehrzahl als blauweiße Einschlußzelle leben und heranwachsen kann. Diese kleineren intrazellulären Formen haben durchweg eine runde, kugelförmige oder ovale Gestalt, im Gegensatz zu den größeren extrazellulären, die in ihrer unregelmäßigen Form Epithelzellen sehr ähnlich werden können.

4. Die blauweißen Zellen sind amöboide Zellen. Die Bewegung ist eine langsame, träge. Sie unterscheiden sich also biologisch in einem sehr wichtigen Punkte von den Epithelzellen, die nach meinen Untersuchungen eine solche Lebenstätigkeit nicht entfalten.

5. Die Wirkung der blauweißen Einschlußzellen auf die Epithelzelle ist zunächst eine mechanische (Zurseitedrängung des Kernes, Eindellung desselben), später eine zerstörende. Der Untergang der Epithelzelle, die Degenerations- und Erweichungsherde innerhalb der Krebszapfen und Alveolen sind meist auf die Anwesenheit einer größeren Zahl von blauweißen Zellen zurückzuführen.

6. Auch die Entstehung der blauweißen Zellen weicht von der der Epithelien ab. Diese vermehren sich hauptsächlich auf dem Wege der Mitose. Aus einer Mutterzelle gehen im allgemeinen zwei gleiche

Tochterzellen hervor. Als pathologische Kernteilung kommt bei ihnen auch die amitotische, durch Segmentierung und indirekte Fragmentierung vor (Arnold). Ueber die Entstehung der blauweißen Zellen wissen wir noch nichts Sicheres. Die mikroskopischen Bilder sprechen dafür, daß eine kleine winzige Zelle im Zelleib einer Epithelzelle heranwachsen und sich zu einer größeren Zelle entwickeln kann. Zweiteilung durch Mitose und Amitose habe ich auch bei der extrazellulären, blauweißen Zelle beobachtet. Inwieweit diese bei ihnen vorkommenden Teilungsvorgänge sich von denen der Epithelzellen unterscheiden, bedarf noch eines eingehenden Studiums.

7. Die Widerstandsfähigkeit der blauweißen Zellen ist eine geringere wie die der Epithelzellen; ihr Organismus ist weit zarter und hinfälliger. Epithelzellen spät fixierten, nicht mehr lebendfrischen Gewebes enthalten oft richtige Vakuolen von verschiedener Größe. In diesen Hohlräumen saßen blauweiße Einschlußzellen, die zugrunde gegangen sind, während die resistenteren Epithelzellen erhalten blieben. Auch die extrazellulären blauweißen Zellen scheinen durchweg eine nur kurze Lebensdauer zu haben.

Auf Grund der aufgezählten Unterschiede müssen wir die blauweißen von den Epithelzellen trennen; sie können weder als Platten- noch als Zylinder- oder Uebergangsepithelien angesprochen werden. Aber auch zu den Stromazellen können sie nicht gerechnet werden, und zwar deshalb nicht, weil ihre Heimat, wie das Schnittpräparat zeigt, nicht das bindegewebige Stroma, sondern das Epithelgewebe ist. Vereinzelte, blauweiße Zellen kann man aber gelegentlich im Stromagewebe der Geschwulst antreffen.

Frühere Befunde.

Beziehungen der blauweißen Zellen zu der endogenen Zellenbildung R. Virchows und den Zelleinschlüssen späterer Autoren (Plimmersche Körperchen, Vogelaugen v. Leydens).

Bevor wir die wichtige Frage weiter erörtern, in welche Zellgruppe wir die blauweißen Zellen einzureihen haben, ist es notwendig, einen Blick auf die Literatur zu werfen, ob z. B. die intrazellulär gelegenen blauweißen Zellen Beziehungen zu bereits früher erhobenen Befunden haben. Es ist ja hinlänglich bekannt, daß „Einschlüsse“ in Karzinomzellen durchaus kein neuer Befund auf dem Gebiete der Krebsforschung sind, darüber besteht bereits eine sehr große Literatur. Auch die endogene Zellbildung in Krebszellen gehört hierher.

R. Virchow hat in einer besonderen Arbeit (Virch. Arch. Bd. 3) eingehend die Frage besprochen, ob die endogene Zellenbildung für den Krebs etwas Charakteristisches sei. Er verglich sie mit der endogenen Zellbildung im Knorpelgewebe, einem normalen Wachstumsvorgang, und kam zu dem Urteil, daß zwischen beiden ein Unterschied nicht besteht. Wenn diese Ansicht auch heute als widerlegt gelten kann, und zwar insofern, als es sich beim Knorpelgewebe um einen normalen, beim Krebsgewebe dagegen um einen pathologischen Zellbildungsvorgang handelt, so enthält die aus dem Jahre 1851 stammende Arbeit R. Virchows doch auch heute noch so viele zutreffende Beobachtungen und gibt eine so genaue Darstellung der tatsächlichen Verhältnisse, daß ich ihr Studium jedem, der über die Frage der „Zelleinschlüsse“ beim Krebs arbeitet, sehr empfehlen kann.

In seiner ersten Arbeit über den Krebs aus dem Jahre 1847 (Virch. Arch. Bd. 1) hatte R. Virchow bereits auf das Vorkommen von großen Hohlräumen in den Epithelzellen aufmerksam gemacht. Im Gegensatz zu Bruch, der diese Hohlräume für künstliche Gebilde hielt, stellte Virchow fest: „daß diese glashellen, oft wie Löcher in den Zellen aussehenden Stellen Hohlräume mit einem flüssigen Inhalt sind" (Virch. Arch. Bd. 3. S. 202). Die Hohlräume, die er Bruträume nannte, präexistieren in den Krebsgeschwülsten, und er unterscheidet einfache Hohlräume mit homogenem und solche mit zusammengesetztem Inhalt. Das Wesentliche liegt für Virchow darin, daß beide Arten von Hohlräumen miteinander identisch sind, und „daß alles, was darin vorkommt, als endogene Neubildung gefaßt werden muß". Bei der Betrachtung des Inhaltes der Hohlräume der Krebszellen fand er außer der homogenen und hyalinen Masse, die gewöhnlich in den knorpelartigen Hüllen eingeschlossen ist, verschiedene Arten von Körpern, und zwar wirkliche Kerne und Zellen, und er betont ausdrücklich, daß an dem Vorkommen unzweifelhafter nackter Kerne und kernhaltiger Zellen nicht gezweifelt werden kann. Außer diesen Kernen und Zellen kommen in den Bruträumen auch andere Körper vor, nämlich eigentümliche kernartige Gebilde und Fettmoleküle. Ferner schildert Virchow ein Phänomen, welches das höchste Interesse verdiene, das der spontanen Teilung der Bruträume. Während man beim Krebs in jedem Brutraum nur eine einzige Zelle oder einen einzigen Kern auftreten sieht, findet man zuweilen in demselben Brutraum zwei endogene Körper sich entwickeln, seien es nun wirkliche Zellen oder die kernhaltigen Gebilde. Zunächst liegen die zarten, fein granulierten jungen Zellen dicht nebeneinander, die Kerne an der von der Berührungsstelle abgewendeten Wand; später entwickelt sich von der Wand des Brutraumes ein Vorsprung, der mit einer scharfen Spitze gegen die Berührungsstelle beider Zellen ausläuft und noch später Bildungen, wo bereits eine vollständige Trennung des Brutraumes durch eine Brücke knorpelartiger Substanz und eine innere Teilung stattgefunden hat (s. Virch. Arch. Bd. 3. Tafel II Fig. 2).

Die wichtigste Feststellung R. Virchows ist also die Tatsache, daß in Hohlräumen der Epithelzellen organisierte Gebilde, Kerne und wirkliche Zellen vorkommen, und daß diese Zellen sich sogar durch Teilung vermehren können. Es erschien mir nicht überflüssig zu sein, auf diese Beobachtungen aus der ersten Zeit mikroskopischer Forschung bösartiger Geschwülste hinzuweisen. Ich werde noch Gelegenheit haben, die Befunde anderer Forscher mit ihnen zu vergleichen.

Was nach den Arbeiten Virchows zu diesem Thema geschrieben wurde, ist meist unter dem Titel der „Zelleinschlüsse" veröffentlicht worden. Unter den vielen verschiedenen Formen der Einschlüsse sind im Laufe der Zeit ganz bestimmte immer wieder beschrieben und nachgeprüft worden. Ich nenne hier die Arbeiten von Lebert, Köster, Langhans, Thoma, Nils Sjöbring, Siegenbeck van Heukelom, Kürsteiner, Jos. Schütz, Ribbert, Fabre-Domergue, Gaylord, Foà, Kossinski, Steinhaus, Soudakewitsch, Borrel, Korotneff, Podwyssozki u. Sawtschenko, V. Müller, Vedeler, Stroebe, Ruffer, Walker u. Plimmer, Pianese, Burchardt, Unna, Jürgens, F. J. Bosc (Montpellier), Feinberg, A. Stricker, O. Israel, Nößke, Lubarsch, v. Leyden, L. Pfeiffer, Sanfelice, Honda, Hansemann, Apolant-Embden.

Eine Reihe der hier genannten Autoren hat ihre Arbeiten mit Abbildungen versehen. Noch am besten haben Steinhaus (Virch. Arch. Bd. 126, s. Tafel 18 u. 19), Pianese (Zieglers Beitr. Suppl.-Bd. 1896), Podwyssozki u. Sawtschenko (Centralbl. f. Bakt. Bd. 11. Tafel 1) das vielgestaltige Bild der Einschlüsse wiedergegeben. Auch ihre Beschreibungen ebenso wie die von Nils Sjöbring (Fortschr. d. Med. Bd. 8. 1890. S. 529), Siegenbeek van Heukelom (Centralbl. f. allg. Path. Bd. 1. 1890), Stroebe (Zieglers Beitr. Bd. 11. Heft 1) kann ich als zutreffend anerkennen.

Die große Anzahl tüchtiger Forscher verschiedener Nationen, die sich unter den aufgezählten Namen befinden, zeigt das große Interesse, das diese intrazellulären Gebilde vom Beginn der Krebsforschung an bis auf den heutigen Tag erregt und wach gehalten haben. Am günstigsten wurden die Befunde von Plimmer aufgenommen; unter dem Namen „Plimmersche Körperchen" sind die Einschlüsse der Krebszellen ziemlich populär geworden. Mit den Plimmerschen Befunden stimmen die von Gaylord, v. Leyden und Feinberg überein. Die von v. Leyden als Parasiten des Krebses angesprochenen Körperchen hat er zur näheren und bestimmteren Charakterisierung als „Vogelaugen" bezeichnet. In Wirklichkeit hat die überwiegende Mehrzahl der Untersucher aber denselben Befund beschrieben, wie die beigegebenen Zeichnungen der Arbeiten anschaulich zeigen. Wenn man ihre Schilderungen und Abbildungen mit denen R. Virchows über die endogene Zellenbildung im Krebs vergleicht (Virch. Arch. Bd. 3. Tafel 2), so nimmt man mit Erstaunen wahr, daß fast alles, was spätere Untersucher über Einschlüsse, Invagination usw. der Krebszellen geschrieben haben, in seiner Arbeit bereits enthalten ist. Seine Feststellungen sind um so höher einzuschätzen, als R. Virchow seine Untersuchungen an der ungefärbten Geschwulstzelle angestellt hat — er hat also ein wirkliches Zellenstudium getrieben —, während die späteren Untersucher ihre Beobachtungen fast durchweg am gehärteten und gefärbten Schnittmaterial gewonnen haben. In vieler Hinsicht war das für die Krebsforschung ein Rückschritt. Dieser einseitig bevorzugten Untersuchungsmethode ist es hauptsächlich zuzuschreiben, daß die mikroskopischen Bilder der „Einschlüsse" von vielen falsch gedeutet, und daß noch nicht einmal die Frage geklärt werden konnte, ob es sich um wirkliche Zellen oder Degenerationsprodukte der Epithelien handelt.

Immerhin geht aus den aufgezählten Arbeiten so viel hervor, daß an dem Vorkommen der Einschlüsse in den Krebszellen nicht zu zweifeln ist. Ja man kann sogar behaupten, daß von all den verschiedenen, als Krebsparasiten beschriebenen und gedeuteten Befunden dieser der einzigste ist, der sich behauptet und als ein auffälliger und bemerkenswerter anerkannt ist. Das sagt auch Marchand (D. m. W. 1902. S. 723) mit den Worten: „Die einzige Ausnahme machen gewisse Körperchen, die von einer ganzen Reihe sorgfältiger und geübter Untersucher, Foà, Soudakewicz, Sawtschenko, sodann besonders von Plimmer, von Borrel, und neuerdings von v. Leyden in einer Reihe von Karzinomen, ganz bsonders der Mamma, aufgefunden und von einem Teil dieser Forscher als ganz sicher parasitär, von einem anderen ebenso sicher als nicht parasitär gedeutet wurden. Ein gutes Karzinompräparat, welches diese Körperchen in größerer Zahl — stellenweise eins oder mehrere in jeder Zelle — enthält, macht in der Tat einen frappanten Eindruck, und wenn man erfährt, daß durch Züchtung aus solchen

(nicht ulzerierten) Karzinomen vermehrungsfähige Organismen gewonnen werden konnten, die bei Einführung in den Tierkörper pathologische Veränderungen, wenn auch keine Geschwulstbildungen (wie von manchen behauptet wurde), hervorriefen, so konnte die Frage ernstlich erwogen werden, ob es sich hier etwa doch um lebende Organismen in den Geschwulstzellen handelt."

Auch das scheint mir nach den bisherigen Untersuchungen festzustehen, daß die intrazellulären Gebilde, wenn auch in den einzelnen Zellen an Zahl sehr wechselnd, doch regelmäßig in den verschiedenen Typen des Karzinoms aufzufinden sind. Plimmer sagt in seiner bekannten Arbeit (The Practitioner, April 1899, S. 5): „Ich habe konstatiert, daß diese eigentümlichen Körper in allen Krebsen gefunden werden. Dies sage ich nach einer Erfahrung von ca. 1500 Fällen. Auch im pathologischen Institut von Buffalo wurde eine systematische Untersuchung mit Rücksicht auf diese Behauptung angestellt, und Dr. Gaylord behauptet, daß diese Gebilde in allen Karzinomen vorhanden sind." Ich selbst habe sie in keinem einzigen Falle von zellreichem Krebs vermißt, wobei ich allerdings bemerken muß, daß ihr Vorkommen in den verschiedenen Partien der epithelialen Wucherung kein gleichmäßiges, sondern ein durchaus unregelmäßiges sein kann.

Durch die zahlreichen, zum Teil wenig kritischen Arbeiten ist der Ausdruck „Zelleinschlüsse" in Mißkredit geraten. Vertreter der pathologischen Anatomie haben darauf aufmerksam gemacht, daß Einschlüsse von gleichem Aussehen auch in normalen Epithel- und Drüsenzellen gelegentlich angetroffen werden können. Die Tatsache des Vorkommens in den Epithelzellen nicht bösartiger Wucherung mag zugegeben werden. Aber wer konnte denn bisher auf Grund der morphologischen Charaktere allein entscheiden, daß diese Einschlüsse mit denen beim Karzinom vorkommenden identisch sind? Und können die Anhänger der parasitären Theorie des Krebses nicht geltend machen, daß auch in gutartigen Epithelwucherungen Schmarotzer vorkommen können, die von den in Krebsen anzutreffenden Epitheleinschlüssen morphologisch nicht zu unterscheiden sind? Nach meinen Erfahrungen muß man bei der Beurteilung von sog. Einschlüssen die größte Vorsicht walten lassen; denn die verhältnismäßig kleinen intrazellulären Gebilde sind sich oft täuschend ähnlich. Man kann sogar ähnliche jederzeit experimentell erzeugen. Wenn man Hühnerblut in die Bauchhöhle eines Meerschweinchens spritzt, kommt es zu einer starken Phagozytose der Hühnerblutkörperchen durch die Mikro- und Makrophagen der Bauchhöhle; auch die Peritonealendothelien phagozytieren, und so können durch die Reste und Kerne der Hühnerblutkörperchen Bilder entstehen, die mit denen in den Epithelien eines Krebses eine große Aehnlichkeit haben, und doch sind beide voneinander grundverschieden.

Auf Grund der experimentellen Erzeugung von Zell-, hat man den Krebseinschlüssen jede besondere Bedeutung absprechen zu müssen geglaubt. So schreibt J. Wolff (Die Lehre von der Krebskrankheit. Jena, Verlag G. Fischer, 1907, S. 675): „Das Verdienst, die Frage nach der Herkunft der Plimmerschen Gebilde dem ständig auf- und abwogenden Streite der Meinungen und Auslegung entrückt und auf experimentellem, unanfechtbarem Wege gelöst zu haben, gebührt unzweifelhaft Spirlas. Durch Injektion von frischen Krebszellen in die Bauchhöhle des Kaninchens konnte Spirlas nach 24—50 Std. in den Lymphozyten typische Plimmer-Körperchen nachweisen.

Aber auch bei der Injektion von Plazentarzellen, Spermatozoen, Sarcinen, Leberzellen und steriler Kochsalzlösung konnte Spirlas dieselben Gebilde hervorrufen.

Die Entstehung dieser Körperchen konnte Schritt für Schritt verfolgt werden. Sie sind, nach Spirlas, nichts anderes als die von den Lymphozyten aufgenommenen und verdauten Leukozyten; es sind also Verdauungsvakuolen, in denen als Rest der Leukozyten ein intensiv färbbarer Kern gelegen ist."

In Wirklichkeit ist mit solchen Versuchen gegen die Spezifizität der Einschlüsse beim Krebs nichts bewiesen.

Herrscht also über das regelmäßige Vorkommen und die Spezifizität der Einschlüsse der Krebszellen im allgemeinen Uebereinstimmung, so gehen die Meinungen über ihre Natur und ihre Entstehung weit auseinander.

Eine Reihe von Untersuchern, wie Sjöbring, Foà, Thoma, Kürsteiner, Podwyssozki u. Sawtschenko, Soudakewitsch, Plimmer, v. Leyden, Feinberg, halten sie für parasitäre Bildungen und sind zum Teil kräftig für diese Ansicht eingetreten; andere haben diese Frage offen gelassen. Nach v. Leyden darf man sie „mit einem nicht geringen Grad von Wahrscheinlichkeit als Protozoen (Protistenamöben) ansprechen". Die Mehrzahl der Untersucher hat sich jedoch gegen die Auffassung der parasitären Natur der Einschlüsse ausgesprochen. Die meisten schließen sich der Ansicht von Nößke, Hansemann, Ribbert an, nach denen es sich nicht um einen Organismus, sondern um Zelleinschlüsse anderer Art handelt. Nach Nößke, der ihnen eine umfangreiche Kritik ohne Beibringung neuer Tatsachen gewidmet hat, sind diese Körperchen nichts anderes als Vakuolen im Protoplasma — was übrigens schon Bruch behauptet hatte und von R. Virchow als Irrtum nachgewiesen wurde — die durch eine Art innerer Sekretion entstehen und eine wechselnde Menge gerinnungsfähiger Substanz enthalten sollen. Diese bilden das zentrale, kernartige Gebilde, durch welches die Aehnlichkeit mit einzelnen Organismen hervorgehoben werde. Es sollen alle Uebergänge von dieser regelmäßigen kleinen Form zu viel größeren vakuolären Räumen bestehen, in denen die festen Bestandteile ganz unregelmäßige Häutchen und kernige Massen bilden. Charakteristisch sind nach Nößke die ersten Anfänge in Gestalt äußerst kleiner, undeutlich bläschenförmiger Kügelchen, die wie gequollene Protoplasmakügelchen aussehen. Die zentralen Kerne sollen nicht die Färbung der Zellkerne annehmen. Die kleinen Körperchen sollen wegen ihrer oft ähnlichen Beziehung zum Zellkern an Zellsphären, Zentrosomen erinnern, dafür wurden sie von Borrel gehalten. Dagegen spricht nach Nößke aber die oft sehr starke Vergrößerung und das nicht selten multiple Auftreten.

Honda-Hansemann (Virch. Arch. Bd. 174. S. 125) können die Natur der fraglichen Gebilde zurzeit nicht sicher aufklären, „wenn auch dieselben sicher nicht als Krebsparasiten betrachtet werden dürfen". Sie werden wahrscheinlich durch eine Sekretion hyaliner Substanz in dem Zellprotoplasma hervorgebracht oder entstehen auch durch eine partielle hyaline Entartung des Zellprotoplasmas.

Ribbert (Das Karzinom des Menschen, S. 380) dagegen hält die fraglichen Körper für regressiv umgewandelte zellige Elemente, die in das Protoplasma der Epithelien eingeschlossen werden. Hauptsächlich handele es sich um veränderte Epithelien, die von anderen auf-

genommen oder invaginiert worden seien. Man könne alle Zwischenstufen zwischen noch gut erkennbaren Zellen und den Endprodukten der regressiven Metamorphosen auffinden.

Wie aus den angeführten Urteilen hervorgeht, hat zwar jeder Untersucher seine besondere Ansicht über die Art und Entstehung der Einschlüsse; darin stimmen sie jedoch überein, daß sie als Degenerationszustände der Epithelien aufgefaßt werden.

Würde der Beweis gelingen, daß die Einschlüsse keine Vakuolen oder Gerinnungsprodukte des Protoplasmas der Epithelzellen sind, sondern besondere, selbständige, der Wirtszelle artfremde Gebilde, so würde damit ein großer Schritt vorwärts hinsichtlich ihrer parasitären Natur gemacht sein.

Welche Beweise lassen sich dafür anführen?

Daß wir in den Einschlüssen nichts anderes zu erblicken haben, als was R. Virchow unter dem Namen endogene Zellenbildung der Krebszellen beschrieben hat, war oben bereits gesagt worden. Die wichtigste Feststellung seiner Untersuchungen war die Tatsache, daß in Hohlräumen der Epithelzellen organisierte Gebilde, Kerne und wirkliche Zellen vorkommen, ja daß diese Zellen sich durch Teilung sogar vermehren können.

Damit wäre schon die Annahme derjenigen Forscher, die nach R. Virchow diese Gebilde untersucht und sie als Degenerationsprodukte angesehen haben, widerlegt. Daß R. Virchow diese Dinge richtiger gesehen hat, ist wohl darauf zurückzuführen, daß er seine Beobachtungen am frischen Gewebe, an der Zelle selbst, nicht am gehärteten und gefärbten Material gemacht hat. Die Entscheidung ist eben an einem derart veränderten Gewebe, wie es das Schnittmaterial ist, nicht zu stellen. Nicht zutreffend ist allerdings die Auffassung R. Virchows, daß die endogene Zellenbildung der Krebszellen derjenigen der Knorpelzellen gleichzusetzen sei.

Komme ich nun zu meinen eigenen Beweisen für die Zellennatur der „Einschlüsse“, so wäre folgendes zu sagen:

Die intrazellulären Formen der blauweißen Zellen, wie ich sie eben beschrieben habe, sind die endogenen Zellen R. Virchows; sie sind ferner identisch mit den Einschlüssen und Einschlußzellen der zahlreichen Autoren, die nach ihm ihre Beobachtungen als neue Befunde mehr oder weniger genau beschrieben haben. Das läßt sich mit der Vitalfärbung der lebendfrischen, mit einer blauweißen Einschlußzelle behafteten Epithelzelle einwandfrei feststellen. Wir sehen, wie innerhalb der Epithelzelle eine andere, wirkliche, aus Kern und Protoplasma zusammengesetzte Zelle gelegen ist, deren Eigentümlichkeiten ich bereits bei der Schilderung der blauweißen Zellen aufgezählt und die ich in Zeichnungen und Mikrophotogrammen abgebildet habe. Mit meinen Untersuchungsmethoden habe ich also die tatsächlichen Befunde R. Virchows bestätigen können, wenn ich auch ihrer Deutung nicht beitreten kann. Aehnlich liegen übrigens die Verhältnisse bei den Mäusekarzinomen. Als Beweis für die Spezifizität der blauweißen Zellen möchte ich hier die Tatsache anführen, daß die blauweißen Zellen und Einschlußzellen auch **regelmäßig** in den bei Mäusen spontan auftretenden und experimentell zu erzeugenden Krebsen und Adenomen zu finden sind. Am zahlreichsten konnte ich sie in dem experimentellen Frankfurter Mäusekarzinom antreffen. Ich werde in einer

besonderen Arbeit über die Zellen des Mäuse- und Rattenkrebses auf diesen wichtigen Punkt ausführlich eingehen.

Aber nicht nur die Zellennatur der Einschlüsse, wenigstens soweit es sich um die aus Kern und Protoplasma bestehenden, wohlcharakterisierten Gebilde handelt, wird durch die Vitalfärbung zur Gewißheit, wir sehen auch, daß die verschieden großen Einschlußzellen einen anderen Zelltyp darstellen, jedenfalls keine Epithelzellen sind.

Es wäre ja immerhin möglich, daß bei Epithelzellen eine endogene Zellbildung vorkäme; aber abgesehen davon, daß wir darüber nichts wissen, und eine solche Zellteilung und ein solcher Vermehrungsvorgang auch bisher bei ihnen noch nicht beobachtet ist, müßte doch die in einer Epithelzelle endogen gebildete, also die Tochterzelle, dasselbe Aussehen und denselben Charakter der Mutterzelle aufweisen. Das ist aber nicht der Fall. Im Gegenteil, wir sehen in der Epithelzelle eine von ihr morphologisch, färberisch und biologisch verschiedene Zelle sich bilden und heranwachsen, eine Zelle, die amöboide Eigenschaften hat, welche die Wirtszelle schädigen und sie vernichten kann.

Das ist aber ein wirkliches parasitäres Verhalten und zwingt mit logischer Schlußfolgerung zu der Annahme, die blauweiße Zelle als eine artfremde, als eine parasitäre anzusehen.

Damit wäre das Krebsproblem wieder zu der Frage zurückgekehrt, welche die Forschung schon sehr frühzeitig auf das eifrigste beschäftigt hat: Gibt es eine spezifische Krebszelle?

Hannover, Lebert, Sédillot (Sitzung der Académie des Sciences 14. Sept. 1846) und Meckel (Sitzung der Naturforscherversammlung zu Kiel 22. Sept. 1846) haben sich seinerzeit, wie Virchow in seiner Arbeit (Virch. Arch. Bd. 1. S. 104) hervorhebt, auf das entschiedenste für die Heterologie der Krebszellen ausgesprochen, und bedeutende französische Forscher haben lange an dieser Auffassung festgehalten, bis auch hier die Ansicht R. Virchows allgemeine Anerkennung fand, daß es keine für den Krebs charakteristische Zellen gäbe.

Wie erklärt es sich übrigens, daß einige Untersucher die Einschlüsse als Vakuolen deuten konnten, während anderen die Zellennatur der Gebilde über jeden Zweifel erhaben war?

Die Erklärung dafür ist nicht schwierig. Ich hatte schon hervorgehoben, daß Schnittpräparate, die von nicht lebendfrischem, sondern älterem Material angefertigt sind, sich nicht dazu eignen, ein richtiges Urteil über die wirklichen Verhältnisse zu gewinnen. In einem derartigen Gewebe sind in der Tat in den Epithelien oft richtige Vakuolen vorhanden; sie verdanken ihre Entstehung der großen Hinfälligkeit der blauweißen Einschlußzellen; infolge der späten Fixierung des Gewebes ist die Einschlußzelle, in erster Linie ihr zarter Zelleib, zugrunde gegangen. Uebrig geblieben ist nur ein leerer Raum, der dann als Vakuole erscheint. Aber auch am lebendfrischen, gehärteten Material kommt der Untersucher leicht zu einer irrtümlichen Vorstellung eines leeren Raumes, ganz besonders dann, wenn der glashelle, schwer färbbare Zelleib der blauweißen Zellen, z. B. bei einer einfachen Färbung, ungefärbt bleibt, oder bei einer Doppelfärbung die Kontrastfarbe nur unvollkommen aufgenommen hat. Bei der Vitalfärbung mit dem Methylgrün-Pyroningemisch ist ein Irrtum kaum möglich.

Mit dem bloßen Nachweis artfremder Zellen in Karzinomen ist übrigens die wichtige Frage des Krebsproblems: Welche Faktoren bedingen das ungehemmte Wachstum der Epithelzelle? noch keineswegs befriedigend beantwortet. Das wäre der Fall, wenn die heterologen Zellen in einer Menge und einer Verteilung im gewucherten Epithel vorhanden wären, daß die gesamte Neubildung zwanglos auf ihre Anwesenheit zurückgeführt werden könnte und alle Erscheinungen der krebsigen Wucherung eine genügende Erklärung fänden. In den meisten Fällen deckt sich jedoch die Zahl der nachweisbaren blauweißen Zellen durchaus nicht mit dem Umfang der Epithelvermehrung. Denn im Schnittpräparat kann man oft genug Epithelbezirke antreffen, in denen die fraglichen Zellen gar nicht oder so spärlich vertreten sind, daß man Epithelvermehrung und artfremde Zellen nicht in Beziehung bringen kann. Worauf das ungehemmte Wachstum der Epithelzellen beruht, ist also vorläufig noch in Dunkel gehüllt. Wir können darüber nur Vermutungen hegen. Vielleicht verbergen sich unter der großen Zahl der nicht färbbaren Granula und Einschlüsse, die in verschiedener Größe in jeder krebsigen Wucherung anzutreffen sind, kleinere parasitäre Formen. Im Anfange meiner Untersuchungen habe ich diese Granula und Einschlüsse, mit denen manche Epithelzellen vollständig ausgefüllt sein können, für Produkte einer regressiven Degeneration und Fettmetamorphose gehalten. Aber einmal kommen sie auch zwischen und in ganz jungen Epithelzellen vor, die noch nicht der regressiven Entwicklung verfallen sind, und weiter werden sie auch durch Osmiumsäure nicht geschwärzt, während die Fettgranula zerfallener Epithelzellen diese Reaktion zeigen. Endlich kann man außer den blauweißen Zellen im Innern einer Epithelzelle, wie bereits bemerkt, noch verschiedene andere Einschlüsse sehen, die mit unseren gewöhnlichen Färbungen nicht darstellbar sind und bei denen eine Differenzierung nicht zu erkennen ist. Aber daß sie keine Fettmoleküle oder Bestandteile des Zellprotoplasmas sind, geht daraus hervor, daß diese ungefärbten Einschlüsse zuweilen dieselben Erscheinungen wie die blauweißen Zellen hervorrufen können. Im Mikrophotogramm Tafel II Nr. 16 habe ich eine Epithelzelle mit einem solchen isolierten ungefärbten Einschluß wiedergegeben, der deutlich zeigt, daß er im Begriff ist, den Kern der Epithelzelle einzudellen. Das kann nur ein in der Zelle selbst lebendes und wachsendes Agens bewirken. Auch kann man hier und da Epithelzellen antreffen, die mit Einschlüssen verschiedener Größe behaftet sind, die Uebergänge zur winzigen, aber wohlcharakterisierten, aus Kern und Zelleib bestehenden blauweißen Zelle erkennen lassen (s. Tafel III Zeichnung 5). Es ist möglich, daß unter den ungefärbten Einschlüssen von verschiedener Größe sich die Vorstufen der blauweißen Zellen verstecken. Man könnte sich vorstellen, daß derartige kleinste parasitäre Formen auf die befallenen Epithelzellen einen Reiz ausüben, so daß sie sich vergrößern, teilen und weiterwuchern. Leider verfügen wir zurzeit über keine sichere Methode, mit der sich die verschiedenen ungefärbten Einschlüsse und Granula der Krebsepithelien voneinander unterscheiden lassen.

Die eigentliche Ursache der schrankenlosen Epithelvermehrung bleibt also noch festzustellen. Anders verhält es sich dagegen mit einer weiteren Erscheinung und Eigentümlichkeit des Krebsgewebes, der Degeneration und dem Zerfall der neugebildeten Epithelzellen. Hier besteht ein Zusammenhang zwischen der Anwesenheit der

blauweißen Zellen und dem Untergang der Neubildung. Denn überall dort wo inmitten des neugebildeten Epithelgewebes Degeneration und Zerfall sichtbar ist, lassen sich in den Randpartien des noch erhaltenen Epithelgewebes intrazelluläre und in den bereits degenerierten Partien freie blauweiße Zellen, kenntlich an ihrem dunklen Kern und bei der Methylgrün-Pyroninfärbung an ihren blaugrünen Kernen nachweisen. Wo sie also vorhanden sind, kommt es zur Zerstörung des Epithelgewebes und zu regressiven Vorgängen innerhalb der neugebildeten Epithelien. Menschlicher und Mäusekrebs und zwar sowohl das spontane wie das experimentell erzeugte Mäusekarzinom (Frankfurter Tumor) stimmen in dieser Beziehung vollkommen überein.

Sind die von mir beschriebenen blauweißen Zellen aber artfremde heterologe Zellen, dann können es nur Protozoen sein. Damit ist schon gesagt, daß die blauweiße nicht die einzige Zellform sein kann, unter der der fremde Organismus als Parasit im Krebse auftritt. Es muß noch andere Formen geben, eine Vorstellung, die uns ja von anderen Zellschmarotzern, wie z. B. den Parasiten der Malaria, bereits geläufig ist.

Es sei hier daran erinnert, daß eine Anzahl von Untersuchern, die für die parasitäre Natur der Zelleinschlüsse beim Krebs eingetreten sind, bereits die Frage erörtert haben, zu welcher Gruppe der Protozoen diese Zellschmarotzer zu rechnen seien. Die Mehrzahl hat dieselben als Sporozoen bezeichnet; einige Autoren haben sogar schon einen ganzen Entwicklungszyklus aufgestellt.

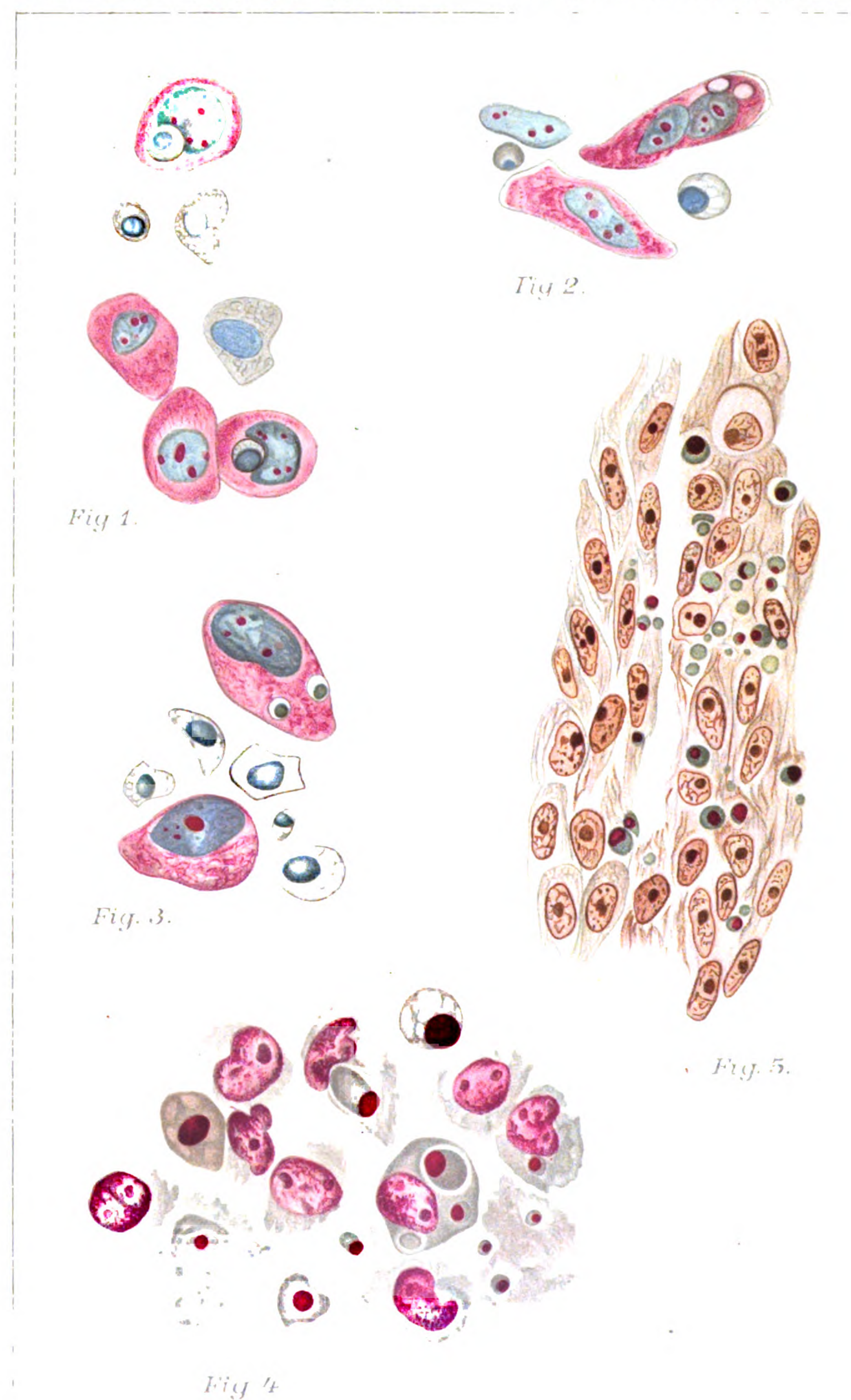
Weitergehende Schlußfolgerungen an die Befunde zu knüpfen, halte ich zunächst für zwecklos. Ich begnüge mich vorläufig damit, auf das Vorkommen besonderer amöboider Zellen im Krebs, auf ihre Existenz außerhalb und innerhalb der Epithelzellen, auf die Identität dieser extra- und intrazellulären Formen aufmerksam und einen Weg zum Zellstudium der bösartigen Geschwülste gezeigt zu haben. In besonderen Aufsätzen werde ich das Vorkommen anderer auffallender Zellformen, so das der sogenannten nackten Kerne, der großen granulär und alveolär gebauten amöbenartigen Zellen, ihre Deutung und ihr Verhältnis zu den Epithelzellen behandeln. Verschweigen möchte ich jedoch an dieser Stelle nicht, daß manche Arbeiten der 90er Jahre des vorgehenden Jahrhunderts wenigstens hinsichtlich der Morphologie der Einschlüsse der Wahrheit nahegekommen sind. Aber den springenden Punkt, den Zell- und parasitären Charakter der Einschlüsse haben sie nicht zu beweisen, die Einwände der Gegner, die sie für Degenerationsprodukte hielten, nicht zu widerlegen vermocht. An dieser entscheidenden Frage sind bisher alle über Einschlüsse beim Krebs erschienenen Arbeiten gescheitert. Das lag wohl daran, daß es den Untersuchern an einer für die Lösung dieser wichtigen Frage zweckmäßigen Methode der Differenzierung der Geschwulstzellen fehlte.

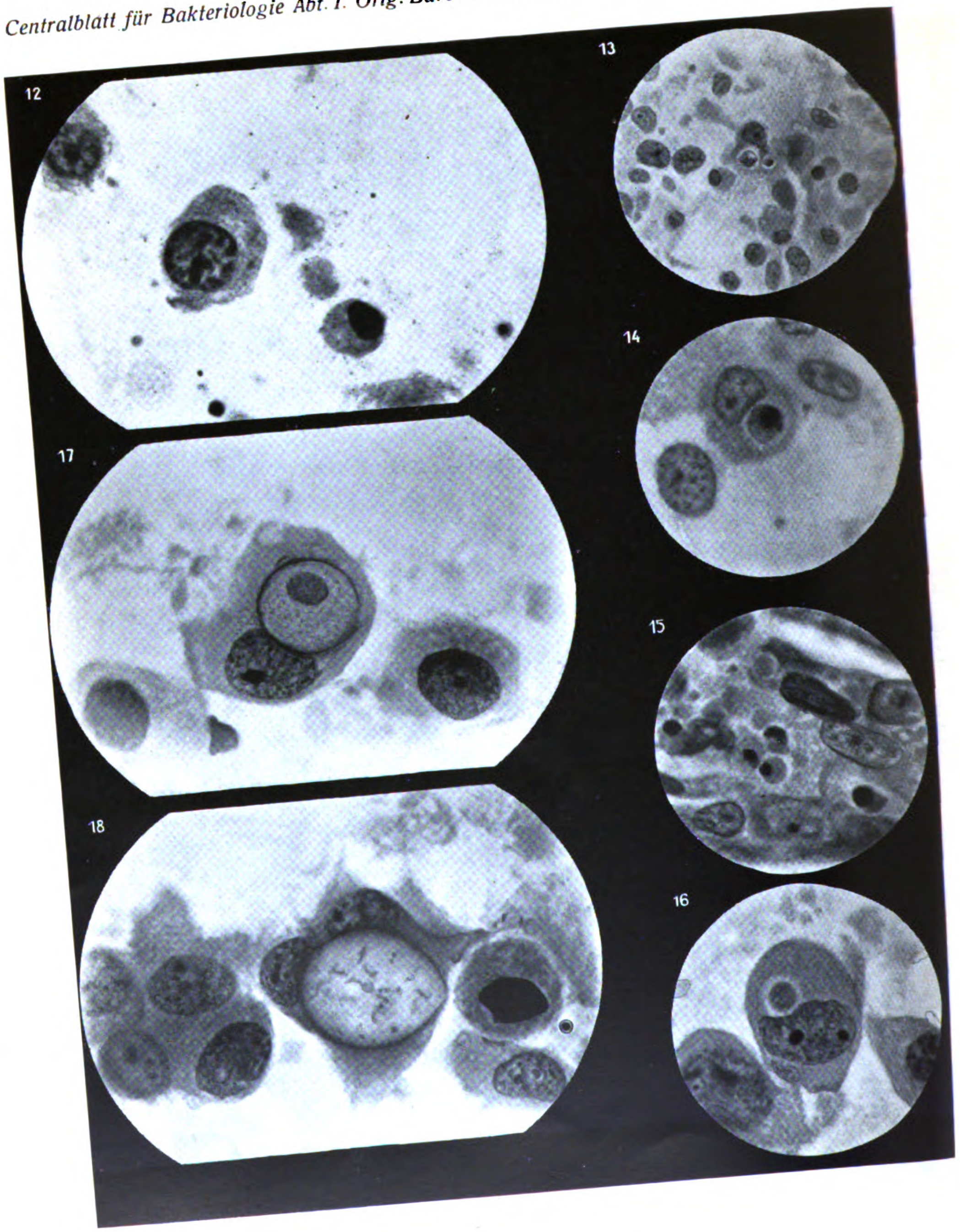
Erklärung zu den Mikrophotogrammen Tafel I und II und der farbigen Tafel III.

Tafel I.

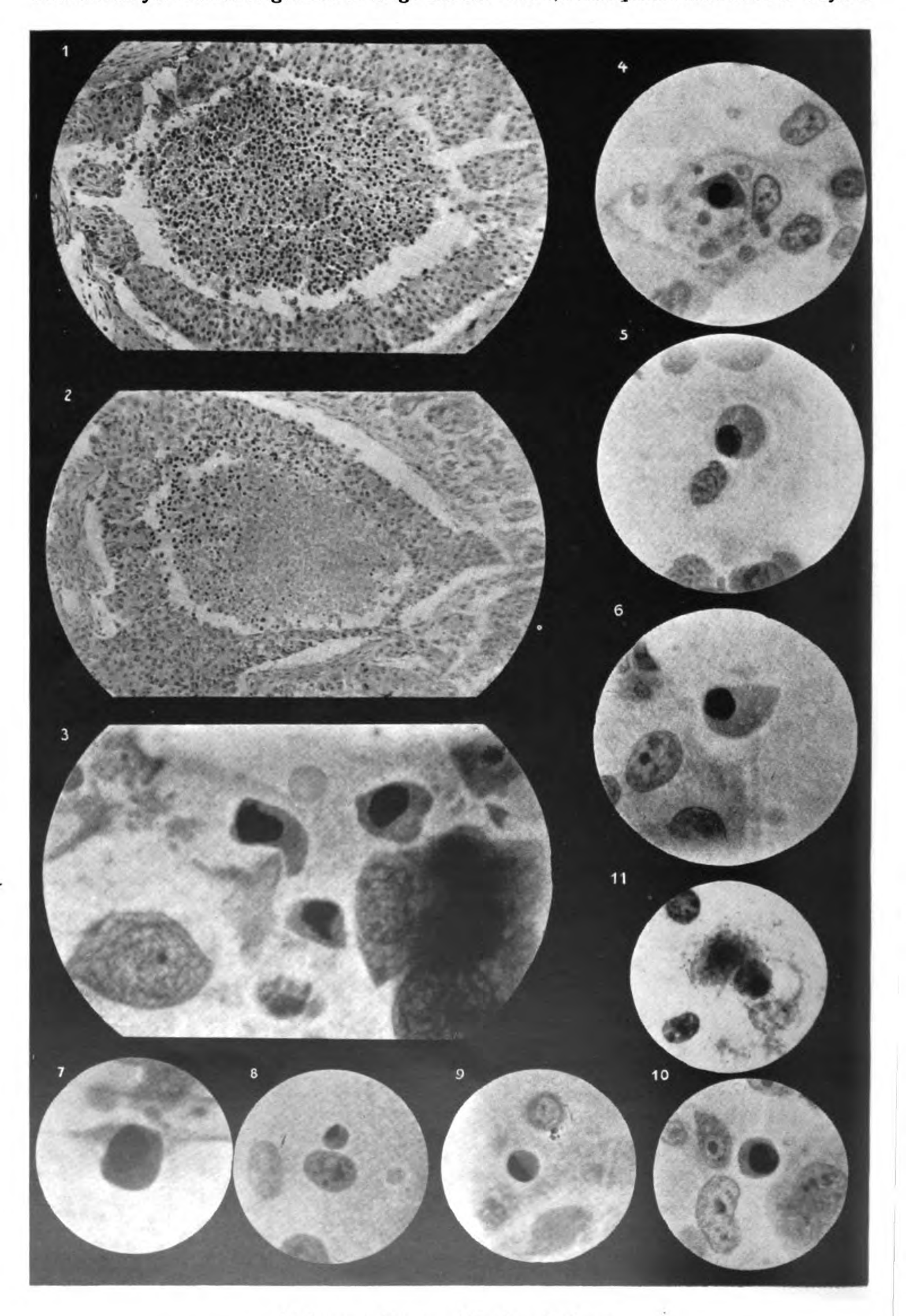
Nr. 1. Schnittpräparat (Vergrößerung 100fach) von einem sehr weichen Karzinom der Mama. Färbung nach Heidenhain. Zeigt innerhalb eines Krebszapfens zahlreiche blauweiße Zellen, die als eine besondere Zellart vom noch erhaltenen Epithelgewebe deutlich zu unterscheiden sind.

Nr. 2. Von einer anderen Stelle desselben Präparats. Innerhalb des Krebszapfens ein Bezirk scheinbarer hyaliner Degeneration, entstanden aus zugrunde gegangenen blauweißen Zellen, von denen noch ein Teil kernhaltig ist.


Fig. 1.
Fig. 2.
Fig. 3.
Fig. 4.
Fig. 5.



Verlag von Gustav Fischer in Jena.



Verlag von Gustav Fischer in Jena.

Nr. 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10 zeigen blauweiße Zellen von verschiedener Größe und Gestalt (Vergrößerung 1000fach). Ausstriche von nicht ulzerierten Mammakarzinomen. T. 17 und 23. Färbung Safranin-Lichtgrün.

Nr. 3 große Formen in amöboider Bewegung zwischen Epithelzellen gelegen.

Nr. 7 einer Epithelzelle ähnlich.

Nr. 5, 6 mehr runde Formen mit randständigem Kern.

Nr. 4 und 11. Blauweiße Einschlußzellen in bereits zerfallenen Zellen.

Nr. 10 Zelle mit großem Kern und schmalem Protoplasma zwischen Epithelkernen.

Nr. 8 und 9 kleinere runde Zellen. 8 neben einem freien Epithelkern, 9 mit randständiger Kernmasse, die einem Kugelabschnitt ähnlich ist.

Tafel II.

Nr. 12. Ausstrich aus einem großzelligen Mammakarzinom. T. 93. Färbung mit Safranin-Lichtgrün (Vergrößerung 1000fach). Links Plattenepithel-, rechts blauweiße Zelle von runder Form.

Nr. 13. In der Mitte des Bildes eine Epithelzelle mit zwei Einschlußzellen (Vergrößerung 500fach. T. 23).

Nr. 14. Blauweiße Einschlußzelle neben dem Epithelzellkern.

Nr. 15. Schnittpräparat, Rektumkarzinom. T. 22. Färbung Safranin-Lichtgrün. 4. Einschlußzellen in einem Gesichtsfelde. Je eine blauweiße Zelle am Rande, 2 in der Mitte des Gesichtsfeldes, als ein anderer Zelltyp deutlich von den großen Epithelkernen zu unterscheiden.

Nr. 16. Ausstrich aus einem Mammakarzinom, T. 35, Safranin-Lichtgrün. Kernloser Einschluß in der hypertrophischen Epithelzelle; Epithelkern an der Stelle des Einschlusses etwas eingedrückt.

Nr. 17 und 18. Ausstrich aus demselben Mammakarzinom wie 16. Hypertrophische Epithelzellen mit hypertrophischen Kernen und großen Einschlüssen, deren Deutung schwierig ist (Zysten?).

Nr. 18 enthält eine große runde blauweiße Zelle neben der Epithel- mit Einschluß.

Tafel III.

Zeichn. 1. Großzelliger Plattenepithelkrebs der Brustdrüse (T. 93). Vitalfärbung mit Methylgrün-Pyronin. 2 Epithelzellen enthalten je eine runde blauweiße Einschlußzelle, die den Kern der Wirtszelle schüsselförmig eingedrückt hat. 3 extrazelluläre blauweiße Zellen von verschiedener Größe und Gestalt. Zeiß Oelimm. Komp.-Ok. 6.

Zeichn. 2. Vitalgefärbtes Präparat von einem Rektumkarzinom (T. 91) zeigt 2 hypertrophische Zylinderepithelzellen. Die obere mit 2 runden ungefärbten Einschlüssen und doppeltem Zellkern. 2 runde blauweiße Zellen und ein freier Epithelkern. Zeiß Oelimm. Komp.-Ok. 6.

Zeichn. 3. Zellreiches Mammakarzinom (T. 97) Vitalfärbung. 2 hypertrophische Epithelzellen. Das Protoplasma der unteren, mit zahlreichen ungefärbten Granula durchsetzt; die obere enthält 2 kleine blauweiße Einschlußzellen. Außerdem 5 extrazelluläre blauweiße Zellen von verschiedener Größe und Gestalt.

Zeichn. 4. Adenocarcinoma mammae (T. 23). In Flemmingscher Lösung fixiertes und in Safranin-Lichtgrün gefärbtes Ausstrichpräparat. Oelimm. Komp.-Ok. 6. Epithelzellen mit Einschlußzellen (blauweißen) von verschiedener Größe. Der Zelleib der großen extrazellulär gelegenen Formen zeigt die Andeutung eines vakuolären Baues. Bemerkenswert der Größenunterschied der blauweißen Zellen.

Zeichn. 5. Schnittpräparat. Rektumkarzinom T. 22. In Flemmingscher Lösung fixiert. Färbung mit Safranin-Lichtgrün, Zeiß Oelimm. Komp.-Ok. 6. Das Epithel durchsetzt mit zahlreichen blauweißen Zellen von verschiedener Größe und noch nicht zu Zellen differenzierten Granula.

Die Zeichnungen 1—4 sind von Frl. Elfr. Paasch, techn. Assistentin am Institut, Zeichnung 5 von Herrn Maler Landsberg gefertigt.

Für die Ueberlassung des Tumormaterials bin ich Herrn Geheimrat Rotter, weiland Chefarzt am Hedwigskrankenhause, und Herrn Dr. Eschenbach, Chefarzt der Maria-Viktoria-Heilanstalt (Berlin, Karlstr.) zu großem Danke verpflichtet.

Ganz besonders danke ich meinem treuen Mitarbeiter Herrn Prof. Zettnow für die Anfertigung der Mikrophotogramme.

Literaturverzeichnis.

Apolant u. Embden, Ueber die Natur einiger Zelleinschlüsse in Carcinomen. (Ztschr. f. Hyg. Bd. 42. 1903.) — Behla, R., Die Carcinomliteratur. Eine Zusammenstellung der in- und ausländischen Krebsschriften bis 1900. Berlin (F. Schoetz) 1901. — Bruch, Die Diagnose der bösartigen Geschwülste. Mainz 1847. — Borrel, A., Les théories parasitaires du cancer. (Ann. de l'Inst. Pasteur. T. 55. 1901. p. 49.) — Bosc, F. J., Les maladies à sporozoaires. La variole, la vaccine, la clavelee (variole du mouton), le cancer. (Arch. de Méd. expérim. T. 13. 1901. p. 253.) — Burchardt, E., Ueber ein Coccidium im Schleimkrebs des Menschen und seine Dauersporencyste. (Virch. Arch. Bd. 131. 1893. S. 121.) — Burkhardt, L., Das Verhalten der Altmannschen Granula in Zellen maligner Tumoren und ihre Bedeutung für die Geschwulstlehre. (Arch. f. klin. Chir. Bd. 65. 1901. S. 135.) — Busse, O., Ueber parasitäre Zelleinschlüsse und ihre Züchtung. (Centralbl. f. Bakt. Bd. 16. 1894. S. 175.) — Bericht über die vom Komitee für Krebsforschung am 15. Oktober 1900 erhobene Sammelforschung. I. Ergänzungsband d. klin. Jahrb. Jena (G. Fischer) 1902. — Cohnheim, Vorlesungen über allgem. Pathologie. 2. Aufl. Berlin 1882. — Fabre-Domergue, Les Cancers épitheliaux. (Histologie. Histogenese, Etiologie. Applications thérapeutiques). 443 S. Paris 1898. Gr. 8° u. Semaine méd. 1891. Nr. 19. — Feinberg, Ueber Amöben und ihre Unterscheidung von Körperzellen. (Fortschr. d. Med. Bd. 17. 1899. Nr. 4.) — Ders., Zur Lehre des Gewebes u. d. Ursache der Krebsgeschwülste. (D. med. Woch. Bd. 28. 1902. S. 185.) — Foà, P., Ueber die Krebsparasiten. (Centralbl. f. Bakt. Bd. 12. 1892. S. 185.) — Gaylord, H. R., The Protozoen of cancier. A preliminary report based upon three year's work in the New York State Pathological Laboratory of the University of Buffalo. (The American Journal of the Med. Sciences. Vol. 121. 5. May 1901. p. 503.) — Ders., Vortrag auf der 74. Versammlung der deutschen Naturforscher und Aerzte in Karlsbad und in der Sitzung des Komitees für Krebsforschung am 4. Oktober 1902. — Ders., Vortrag Orths. (Ztschr. Pathol.-anatom. Arbeiten. Berlin 1903.) — Hansemann, D. v., Kritische Bemerkungen über die Aetiologie der Carcinome. (Berl. klin. Woch. Bd. 31. 1894. S. 11.) — Ders., Ueber die parasitäre Aetiologie des Carcinoms. (Dtsch. med. Woch. 28. 3. 1901. S. 44.) — Ders., Ueber die parasitäre Aetiologie des Carcinoms. Bemerkungen in der Diskussion der Herren Alex. Katz und Ribbert in Nr. 50 dieser Wochenschrift. (Dtsch. med. Woch. 28. 3. 1902.) — Ders., Die mikroskopische Diagnose der bösartigen Geschwülste. 2. Aufl. Berlin (A. Hirschwald) 1902. — Ders., Virch. Arch. 1890. — Honda, Zur parasitären Aetiologie des Carcinoms. (Virch. Arch. Bd. 174. 1892.) — Hertwig, O., Ueber die Ursache der Krebsgeschwülste. Bemerkungen zu der Mitteilung des Herrn Dr. Feinberg. (Dtsch. med. Woch. 28. 13. 1902. S. 221.) — Israel, O., Lungengangrän und Pneumothorax bei Oesophaguscarcinom. (Gesellschaft d. Charitéärzte 1899. Sitz. v. 9. Nov.) — Jollos, Untersuchungen zur Morphologie der Amöbenteilung. (Arch. f. Protistenkd. Bd. 37. 1917.) — Jürgens, Zur Aetiologie des Carcinoms. (Verhandl. d. Berl. med. Ges., 2. Nov. 1898 u. 18. Juli 1900.) — Karg, Ueber das Carcinom. (Dtsch. Ztschr. f. Chir. 1892. 13. 34.) — Katz, A., Zur parasitären Aetiologie des Carcinoms. (Dtsch. med. Woch. 1901. S. 876. 27. 50.) — Klebs, Ueber das Wesen und die Erkennung der Carcinombildung. (Dtsch. med. Woch. 1890. S. 517.) — Köster, Die Entwicklung der Carcinome und Sarkome. Würzburg 1889. — Korotneff, Rhopalocephalus carcinomatodes n. g. n. sp. Krz. (Krebsparasiten). (Centralbl. f. Bakt. Bd. 13. 1893. S. 373.) — Kossinski, Aug., Ueber Physaliphoren in den Krebsgeschwülsten. Warschau 1890. (Russisch.) — Kürsteiner, W., Beiträge zur pathologischen Anatomie der Papillome und papillomatösen Krebse von Harnblase und Uterus. (Virch. Arch. Bd. 130. 1892. S. 463.) — Leyden, E. v., Zur Aetiologie des Carcinoms. (Ztschr. f. klin. Med. Bd. 63. 1901. S. 1.) — Langhans, Beiträge z. path. Histologie d. weibl. Brustdrüse. (Virch. Arch. Bd. 58; Dtsch. Chir. 1887.) — Lebert, H., Traité pratique des maladies cancéreuses et des affections curables confundues avec le cancer. Paris 1851. — Lubarsch, O., Zur Lehre der Geschwülste und Infektionskrankheiten. — Ders., Pathol. Anatomie und Krebsforschung. Wiesbaden 1899, 1902. — Marchand, Ueber Gewebswucherung und Geschwulstbildung mit Rücksicht auf die parasitäre Aetiologie der Carcinome. (Dtsch. med. Woch. 1902. Nr. 39 und 40.) — Müller, v., Ueber Protozoenbefunde im Ovarial- u. Uteruscarcinom. (Monatsschr. f. Geb. u. Gyn. I. S. 561.) — Ders., Ueber celluläre Vorgänge in Geschwülsten. (Virch. Arch. Bd. 130. S. 512.) — Sjöbring, Nils, Ueber Krebsparasiten. (Arch. f. klin. Chir. Bd. 65. 1901. S. 93.) — Ders., Ein parasitärer, protozoaartiger Organismus im Carcinom. (Fortschr. d. Med. Bd. 8. 1890. S. 529.) — Nößke,

Untersuchungen über die als Parasiten gedeuteten Zelleinschlüsse im Carcinom. (Dtsch. Ztschr. f. Chir. Bd. 64. 1902. S. 352.) — Paget, The morton lecture on cancerous diseases etc. (Brit. med. Journ. 1888. p. 1091. — Pianese, G., Beitrag zur Histologie und Aetiologie des Carcinoms. Histol. u. experim. Unters. (I. Supplementheft. (Zieglers Beiträge zur path. Anat. und allg. Path.) Jena (Fischer) 1896. — Pfeiffer, L., Parasitismus des Epithelcarcinoms sowie der Sarko-, Mikro- u. Myxosporidien im Muskelgewebe. (Centralbl. f. Bakt. Bd. 14. S. 118.) — Ders., Die Protozoen als Krankheitserreger zur Aetiologie des Carcinoms. Nachtrag 4. Jena (Fischer) 1895. — Plimmer, H. G., On the etiology and histology of cancer. (The Practit. Spec. Cancer Number 62. 4. 1899. p. 430.) — Podwyssozki, W. u. Sawtschenko, J., Ueber Parasitismus bei Carcinomen nebst Beschreibung einiger in den Carcinomgeschwülsten schmarotzenden Sporozoen. (Centralbl. f. Bakt. Bd. 11. 1892. S. 493, 532 u. 559.) — Ribbert, H., Ueber Einschlüsse im Epithel bei Carcinom. (Dtsch. med. Woch. 1891. S. 1179.) — Ders., Ueber die parasitäre Natur des Carcinoms. (Ibid. 1901. S. 811.) — Ders., Das Carcinom des Menschen. Bern (Verlag Friedr. Cohen) 1911. — Ruffer u. Plimmer, Parasitc Protozoa in cancerous tumours. (Journ. of Pathol. Vol. I. 1892; 2. 1893.) — Ruffer u. Walker, Preliminary note on some parasitic protozoa found in cancerous tumours. (Brit. med. Journ. Vol. 2. 16. July 1892.) — Sanfelice, F., Zelleinschlüsse, Zellentartungen und endozelluläre Parasiten bei bösartigen Geschwülsten. (Centralbl. f. Bakt. Bd. 31. 1902. S. 254.) — Sawtschenko, J., Weitere Untersuchungen über schmarotzende Sporozoen in den Krebsgeschwülsten. (Centralbl. f. Bakt. Bd. 12. 1892. S. 17.) — Schwarz, E., Ueber den Carcinom-Parasitismus. Krit. Studie. (Beitr. z. klin. Med. u. Chir. v. Redaktionskomitee d. Wien. klin. Woch. 1893.) — Schütz, Münch. med. Woch. 1890. Nr. 35 und Mikrosk. Carcinombefunde. Frankfurt a. M. 1890. — Soudakewitsch, Parasitisme intracellulaire des Néoplasies cancereuses. (Ann. de l'Inst. Pasteur. T. 6. p. 543.) — Ders., Recherches sur le parasitisme intracellulaire et intranucléaire chez l'homme. (Ann. de l'Inst. Pasteur. 1892. p. 145.) — Steinhaus, Ueber Carcinomeinschlüsse. (Virch. Arch. Bd. 126. S. 533; Bd. 127. 1892.) — Sticker, A., Ueber den Krebs der Tiere, insbesondere über die Empfänglichkeit der verschiedenen Haustierarten und über die Unterschiede des Tier- und Menschenkrebses. (Arch. f. klin. Chir. Bd. 65. S. 616 u. 1023.) — Siegenbeek van Heukelom, Intercelluläre Gebilde bei Carcinom. (Centralbl. f. allgem. Path. u. path. Anatomie. Bd. 1. 1890. S. 704—709.) — Spirlas, Münch. med. Woch. 1903. Nr. 19. — Thoma, R., Parasitäre Organismen in den Epithelzellen der Carcinome. (Fortschr. d. Med. Bd. 7. 1889.) — Unna, P., Zur Kenntnis der hyalinen Degeneration der Carcinomepithelien. (Dermat. Ztschr. Bd. 1. 1894. H. 1.) — Vedeler, Ueber die Parasiten des Krebses. (Norsk Mag. f. Laeg. Christiania. 160. 1900.) — Verhandlungen des Komitees f. Krebsr. H. 1. Berlin. Sonderabdr. aus der Dtsch. med. Woch. Jahrg. 1904.) — Virchow, R., Die endogene Zellenbildung beim Krebs. (Virch. Arch. Bd. 3. 1851. S. 197.) — Ders., Bemerkungen über die Carcinomeinschlüsse. (Ibid. Bd. 127. S. 188.) — Ders., Zur Entwicklungsgeschichte des Krebses, nebst Bemerkungen über Fettbildung im Körper u. patholog. Resorption. (Arch. f. pathol. Anat. Bd. 1. 1847. S. 94 u. gesammelte Abhandlungen. S. 87.) — Wolff, J., Die Lehre von der Krebskrankheit. Jena (G. Fischer) 1907.

Gibt es beim Menschen eine Vakzine-Encephalitis?

[Aus dem Pathologischen Institut der deutschen Universität Prag (Vorstand: A. Ghon).]

Von Prof. Dr. **Franz Lucksch**[1]).

Mit 3 Abbildungen im Text und 1 Tafel.

In einer kurzen Mitteilung habe ich im Vorjahre über vorläufige Resultate von Untersuchungen, die sich an 3 in ihrer Aetiologie nicht ganz aufgeklärte Todesfälle angeschlossen hatten, berichtet. Diese Unter-

1) Eingegangen am 15. 6. 1925. Red.

suchungen bzw. Nachforschungen wurden nachträglich noch ergänzt und erweitert, und das Gesamtresultat möchte ich jetzt vorlegen.

Im Frühjahre 1923 kamen im nordwestlichen Böhmen 3 merkwürdige Fälle zur Beobachtung, die den Anstoß zu den im Nachfolgenden geschilderten Untersuchungen abgaben.

In der Stadt Tr. waren in einer Familie, deren 4 Kinder gegen Blattern schutzgeimpft worden waren, 2 davon am 9. Tage nach der Impfung erkrankt[1]). Die Symptome der Erkrankung — leichter Opisthotonus, nachher Trismus — waren solche, daß die behandelnden Aerzte an Tetanus dachten. Unser zum Konzilium dorthin berufener Pädiater Prof. Langer, wollte sich dieser Diagnose jedoch nicht anschließen und riet, die Leiche des einen inzwischen verstorbenen Kindes zur Aufklärung des Sachverhaltes obduzieren zu lassen. Langer führte sowohl an der Leiche, wie an dem noch lebenden kranken Kinde die Lumbalpunktion aus; in keinem der beiden Fälle ergaben sich aus der Beschaffenheit des Liquors, der klar war, Anhaltspunkte für Meningitis.

Zur Vornahme der Sektion der Leiche des 6jährigen, am 15. Tage nach der Impfung zugrunde gegangenen Mädchens wurde ich nunmehr von der Behörde nach Tr. entsandt. Die Sektion fand am 2. Tage nach dem Tode am Orte statt. 3 Tage später starb auch das zweite erkrankte Kind, ein 4jähriger Knabe (also 18 Tage nach der Impfung). Die Leiche dieses Kindes wurde ebenfalls 2 Tage nach dessen Tode von mir an Ort und Stelle obduziert. Da der bei diesen Obduktionen erhobene Befund von Wichtigkeit für die Beurteilung der ganzen Sachlage ist, lasse ich beide Sektionsprotokolle folgen.

Protokoll.

Aufgenommen am 1. Juni 1923 in Tr.

Gegenstand ist die sanitätspolizeiliche Obduktion der 6 Jahre alten M. Gr., die am 30. Mai d. Js. gestorben ist. Ueber Auftrag der politischen Landesverwaltung.

Aeußere Besichtigung.

1. Der Körper 113 cm lang, von entsprechendem Knochenbau, mäßiger Muskulatur, ebensolchem Fettpolster. Die allgemeine Decke blaßgrau-gelblich mit mitteldunklen, violetten, nicht ganz zusammenhängenden Totenflecken rückwärts. Totenstarre an den Extremitäten noch vorhanden.

2. In der Gegend der ersten Lendenwirbeldornfortsätze 2 Einstichöffnungen (postmortale Lumbalpunktionsöffnungen) 1 cm von einander entfernt, ganz wenig nach rechts von der Mittellinie. An der Vorderseite des rechten Oberschenkels, etwas unterhalb des Trochanters eine 4 cm im Durchmesser messende Hautstelle, im Bereiche deren die Epidermis abgehoben und zum Teil durchgerissen ist. An dieser Stelle das Corium bloßliegend. Daneben noch 2 oder 3 kleinere, bohnengroße, noch geschlossene, seröse Blasen (von heißen Ziegeln herrührend).

3. Haupthaar blond, kurz geschnitten, Pupillen mittelweit gleich, Conjunctivae blaß. Nasen- und Mundöffnung frei, Lippen blaß.

4. Hals lang, mitteldick, an seiner Hinterseite bis in die Haare hinauf die Haut mit einer schwarzen Salbe eingerieben. Die Gruben am Halse mäßig ausgeprägt. Der Brustkorb schmal, flach. An seiner Vorderseite mehrere Stichöffnungen oberhalb der Mamillae (nach der Tetanus-Antitoxin-Injektion). An der Haut der linken Achselgrube Reste von grauer Salbe.

5. Unterleib mäßig eingezogen, Bauchdecken von geringer Spannung. Aeußeres Genitale dem Alter entsprechend. Untere Extremitäten in den Füßen gestreckt.

6. An der Außenseite des linken Oberarmes, 4,5 cm vom Acromion entfernt, 3 untereinander gestellte, je 2 cm von einander entfernte, etwa 1 cm im Durchmesser messende, dunkelbraune Impfborken, mit etwas Watte bedeckt und festhaftend. Ein

1) Eins der erkrankten hatte am Tage vor der Impfung erbrochen, doch fühlte es sich am Impftage wieder wohl.

Unterschied zwischen den Lymphdrüsen der rechten und der linken Axilla nur insofern, als links ein bohnengroßes, rechts ein hanfkorngroßes Knötchen zu tasten ist.

Innere Besichtigung.

Eröffnung der Schädelhöhle.

7. Weiche Schädeldecken blaß, der Schädel 47 cm im Horizontalumfang, 17 : 14 cm, bis 4 mm dick; an seiner Innen- und Außenfläche keine krankhaften Veränderungen.

8. Die Dura gut gespannt, in ihren Sinus dunkles, überall flüssiges Blut. In beiden Paukenhöhlen kein abnormaler Inhalt.

9. Die inneren Hirnhäute von mittlerem Blutgehalt, saftreicher. Das Gehirn fühlt sich etwas weicher an. Es wird in toto in 4proz. Formalinlösung eingelegt.

Eröffnung der Brusthöhle.

10. Zwerchfellstand rechts an der 4. Rippe, links im 4. Interkostalraum; die Schilddrüse entsprechend groß, blaß, graurötlich. Die Schleimhaut der Mund- und Halsorgane blaß, die Tonsillen beide haselnußgroß, in der linken grünliche Eiterpfröpfe. Im Pharynx weißlich-gelber Schleim. Der Aditus ad laryngem frei.

11. Der Thymus 7 cm lang, bis 3 cm breit, bis 1,5 cm dick. Beide Lungen frei, im Pleuraraum kein abnormer Inhalt.

12. Oesophagus blaß, livide. Die sämtlichen Lymphdrüsen im Mediastinum frei von Tuberkulose, Larynx und Trachea blaß und ohne Besonderheiten. Die Lungen vorne blaß, rückwärts gerötet, überrall lufthältig, ohne jede krankhafte Veränderung.

13. Im Herzbeutel wenig klares Serum. Das Herz entsprechend groß, entsprechend konfiguriert, mäßig fettbewachsen, glatt. Der Muskel etwas heller braun, fest; Klappen allenthalben zart, ebenso die Intima der entsprechend weiten Gefäße.

Eröffnung der Bauchhöhle.

14. Im Abdomen kein abnormaler Inhalt, der Situs viscerum normal.

15. Die Leber entsprechend groß, normal geformt, glatt, von mittlerer Konsistenz und blaßbraunroter Färbung, mit einzelnen helleren Flecken. In der Gallenblase braungelbe Galle von mittlerer Konsistenz. Die Zeichnung der Leber etwas undeutlich.

16. Milz 11 : 5 : 5·2 cm, glatt, bläulich-rot, von mittlerer Konsistenz, mit deutlichen Follikeln.

17. Magen mittelgroß, enthält eine dünne, schwärzliche Flüssigkeit, an der Schleimhaut einige punktförmige Blutaustritte und im Fundus einzelne, durch postmortale Andauung entstandene bis bohnengroße Schleimhautdefekte.

18. Processus vermiformus eingerollt, intakt. Im unteren Teile des Ileums eingedickte, schwarzbraune Massen, desgleichen im Dickdarm ebenso gefärbte Fäces. Schleimhaut des ganzen Darmes blaß. Pankreas o. B.

19. Die Nebennieren entsprechend groß, die Rinde von gelber Farbe. Nieren gleichfalls entsprechend groß, normal geformt, glatt, blutreich. Die Harnblase weit, mit leicht trübem, blassem Harn gefüllt, ihre Schleimhaut blaß. Das innere Genitale dem Alter entsprechend, ohne jegliche Veränderungen.

Die nachträgliche genaue Untersuchung der Hände und Füße ergibt keinerlei Verletzungen an denselben, nur in der Ellenbeuge finden sich noch 2 Einstichöffnungen (nach intravenöser Injektion).

Protokoll.

Aufgenommen am 4. Juni 1923 in Tr. Gegenstand ist die sanitätspolizeiliche Obduktion des 4 Jahre alten H. Gr.

Aeußere Besichtigung.

1. Der Körper 103 cm lang, von mittlerem Knochenbau, mäßiger Muskulatur, geringem Fettpolster. Die allgemeine Decke blaß-gelblichgrau, an der Rückseite blasse, mäßig ausgeprägte Totenflecke und an der rechten Seite des Dornfortsatzes des 2. Lendenwirbels eine Einstichöffnung. Totenstarre fast ganz verschwunden.

2. Haupthaar blond, kurz geschoren. Pupillen etwas weiter, gleich; sichtbare Schleimhäute blaß; Nasen- und Mundöffnungen frei.

3. Hals ziemlich lang, schmal. Brustkorb lang, schmal, wenig gewölbt. In der linken Achselhöhle Reste von grauer Salbe.

4. Unterleib in Brusthöhe, die Bauchdecken grünlich verfärbt, wenig gespannt, äußeres Genitale dem Alter entsprechend, untere Extremitäten ohne Besonderheiten. Am linken Oberarm außen untereinander drei 1 cm im Durchmesser messende,

je 2 cm von einander entfernte, dunkelbraune, festhaftende Impfborken. An der Vorderseite der Brust und in der rechten Ellenbeuge mehrere Einstichöffnungen nach Injektionen.

Innere Besichtigung.

Eröffnung der Schädelhöhle.

5. Die weichen Schädeldecken blaß, der Schädel 48 cm im Horizontalumfang, 16:14 cm, 3 mm dick, an der Innen- und Außenseite ohne Veränderung. Die harte Hirnhaut gut gespannt, in ihren Sinus reichliches, dunkles, flüssiges Blut.

6. Die weichen Hirnhäute allenthalben stark injiziert, etwas ödematös, sonst aber ohne jede Veränderung; das Gehirn wurde in toto in Formalin der histologischen Untersuchung zugeführt.

Eröffnung der Brusthöhle.

7. Schilddrüse mittelgroß, hellrotbraun, homogen.

8. Schleimhaut der Halsorgane blaß, Zungengrundfollikel vergrößert. Tonsillen haselnußgroß, mit grünen Eiterpfröpfchen durchsetzt. Die Schleimhaut des Oesophagus, der Trachea und des Kehlkopfes blaß, ohne Besonderheiten. Sämtliche Lymphdrüsen des Lungenhilus frei von Tuberkulose.

9. Die Pleurahöhlen leer, die Lungen vollständig frei, blaß, normal gestaltet, glatt, auf Durchschnitten überall lufthältig.

10. Im Herzbeutel wenig klares Serum, das Herz entsprechend groß und konfiguriert, glatt; an der Vorderseite des rechten Ventrikels 2 hirsekorngroße Blutaustritte. Sämtliche Klappen zart, der Muskel etwas blasser braun, ziemlich fest; Aorta und übrige Gefäße ohne Veränderung.

Eröffnung der Bauchhöhle.

11. Im Abdomen kein abnormer Inhalt, der Situs viscerum normal. Die Leber entsprechend groß und geformt, blaßbräunlich, glatt, mit verwischter Zeichnung, mittelfest; in der Galle dunkelgrüne, ziemlich dickflüssige Galle.

12. Die Milz entsprechend groß, glatt, schlaff, mit deutlichen Follikeln, von der Pulpa wenig abstreifbar.

13. Nebennieren blaß, Rinde weißgelblich; die Nieren entsprechend groß, glatt, blaß graurötlich.

14. Harnblase kontrahiert, mit leicht trübem, gelblichem Harn gefüllt.

15. Der Magen ziemlich weit, enthält grünlich-weißliche breiige Massen, seine Schleimhaut postmortal angedaut, blaß. Im Darme bräunliche Chymus- bzw. Kotmassen, seine Schleimhaut blaß, der Prozessus ohne Besonderheiten.

16. Das Pankreas ohne Veränderungen.

Es hatte demnach die Sektion in keinem der beiden Fälle eine Aufklärung bezüglich der Todesursache gebracht, da die Rötung der Meningen und des Gehirns in dem einen Falle (Knabe H. Gr.) keinen bestimmten Schluß auf die Todesursache erlaubte, in dem anderen Falle aber überhaupt nichts gefunden wurde, was den Tod hätte erklären können. Die Feststellung der Diagnose mußte also der mikroskopischen Untersuchung der beiden Gehirne vorbehalten bleiben.

Die histologische Untersuchung ergab in beiden Fällen im Pons bzw. in den Pedunculi der betreffenden Gehirne typische, perivaskuläre Infiltrate, der Hauptsache nach aus Lymphozyten und Plasmazellen bestehend, bei gleichzeitiger fleckenweiser Gliawucherung. Im Falle H. Gr. kam noch eine stark ausgeprägte Hyperämie hinzu. Die Veränderungen waren so charakteristisch, daß die Diagnose auf Encephalitis epidemica acuta ohne weiteres gestellt werden konnte. Dementsprechend sprach sich das Gutachten in beiden Fällen dahin aus, daß nach dem histologischen Befund Encephalitis epidemica acuta diagnostiziert werden müsse, daß darnach die Diagnose auf Tetanus wegfalle und daß ein ätiologischer Zusammenhang zwischen der Gehirnaffektion und der Blatternschutzimpfung nicht bestehe.

Diese Untersuchungen waren kaum durchgeführt, als sich unter ganz gleichen Umständen in einem $^3/_4$ Wegstunden von Tr. entfernten Fabriksorte P. ein dritter Todesfall ereignete.

Kurze Krankengeschichte.

St. E., $6^3/_4$ Jahre altes Mädchen, wurde am 22. 5. 1923 gegen Blattern schutzgeimpft. Am 26. 5. Schmerzen in der betreffenden Schulter; kalte Umschläge. 28.—29. 5. Das Kind phantasiert, Kopfschmerzen, 2. 6. Kopfschmerzen, Gelenkschmerzen, Fehlen der Patellarreflexe, leichte Somnolenz, Temperatur 37,2°. 3. 6. Vollständige Somnolenz, Schielen. 4. 6. Temperatur 38,7°, Sopor, Pupillen ohne Reaktion. 5. 6. Lumbalpunktion, klarer Liquor. 6. 6. Exitus.

Die Obduktion wurde gleichfalls am 2. Tage nach dem Tode von mir an Ort und Stelle vorgenommen.

Protokoll.

Aufgenommen am 8. 6. 1923 in P. bei Tr.

Gegenstand ist die sanitätspolizeiliche Obduktion der Leiche der St. E., $6^3/_4$ Jahre alt.

Aeußere Besichtigung.

1. Der Körper 116 cm lang, von zartem Knochenbau, schwacher Muskulatur, geringem Fettpolster. Die allgemeine Decke gelblichbraun, mit ausgebreiteten violetten Totenflecken rückwärts. Totenstarre an den Extremitäten noch vorhanden. In der Gegend des ersten Lendenwirbeldornfortsatzes rechts eine Einstichöffnung (nach Lumbalpunktion).

2. Haupthaar braun, reichlich. Lider leicht verklebt, Pupillen mittelweit, gleich. Bindehäute blaß. Nasen- und Mundöffnung mit Schleim verunreinigt. Lippen blaß, livide, Gebiß defekt.

3. Hals mittellang, proportioniert, Brustkorb flach, nach unten zu etwas breiter, von mittlerer Länge. Am linken Oberarm 3 untereinander gestellte, je 1 cm im Durchmesser messende, mit flachen braunen Krusten bedeckte Stellen in der Haut, 4 resp. 2 cm von einander entfernt.

4. Der Unterleib etwas eingezogen; die Bauchdecken grünlich verfärbt, am äußeren Genitale und an den unteren Extremitäten keine Veränderrungen.

Innere Besichtigung.

Eröffnung der Schädelhöhle.

5. Die weichen Schädeldecken blaß; der Schädel $47^1/_2$ cm im Horizontalumfang, 16:14 cm, bis 5 mm dick.

6. Die harte Hirnhaut gut gespannt, in ihren Sinus allenthalben dunkles, flüssiges Blut. In den beiden Paukenhöhlen kein abnormer Inhalt.

7. Die weichen Hirnhäute allenthalben zart, stark injiziert, das Gehirn normal konfiguriert, saft- und blutreich. Die basalen Gefäße und die Hirnnerven ohne jede Veränderung. Das Gehirn wurde in Formalin der histologischen Untersuchung zugeführt.

Eröffnung der Brusthöhle.

8. Zwerchfellstand rechts an der 4., links an der 5. Rippe. Schilddrüse mittelgroß, rotbraun, homogen. Die Schleimhaut des Mundes und der Halsorgane blaß. Zungengrundfollikel reichlich, hanfkorngroß. Tonsillen haselnußgroß, dicht mit eingedickten Eiterpfröpfchen durchsetzt. Thymus dem Alter entsprechend groß, braunrot.

9. Die Lungen vollkommen frei, glatt. Die Pleurahöhlen leer. Auf Durchschnitten die Lungen allenthalben lufthältig, in den Bronchien, besonders des rechten Unterlappens, glasiger Schleim.

10. Das Herz mit dem Herzbeutel, besonders in den oberen Anteilen verwachsen, mäßig fettbewachsen, entsprechend groß und gewöhnlich geformt. Der Muskel blaß, etwas weicher. Im Endokard des linken Ventrikels einzelne Vibices. Die Klappen allenthalben zart. Supravalvulär in der Aorta einzelne streifenförmige, weißliche Intimaverfärbungen.

Eröffnung der Bauchhöhle.

11. Das Coecum frei beweglich. Sonst keine Veränderungen im Situs. Im Abdomen kein abnormer Inhalt. Die Leber entsprechend groß, glatt, gewöhnlich geformt, blaßbraun, etwas weicher. Die Zeichnung etwas verwischt. In der Gallenblase dunkelbraune, dünnflüssige Galle.

12. Die Milz aufs Doppelte vergrößert, glatt; Kapsel gespannt, tiefere Einkerbungen am M. crenatus; am Durchschnitt deutliche Follikel, wenig Pulpa abstreifbar.

13. Der Magen ziemlich weit, enthält eine bräunliche, dünne Flüssigkeit. Schleimhaut blaß. Der Dünndarm blaßrötlich, mit gelblich schleimigem Inhalt. Im Dickdarm bräunliche Kotmassen, und zahlreiche Oxyuriden, Schleimhaut blaß. Der Prozessus vermiform. 12 cm lang, durchgängig. Das Pankreas entsprechend groß, rötlichgrau (angedaut).

14. Die Nebennieren entsprechend groß, dünn, Rinde gelblichweiß. Die Nieren mittelgroß, glatt, rotgrau, mit normaler Zeichnung. Die Harnblase erweitert, mit hellgelbem Harn gefüllt, ihre Schleimhaut blaß.

15. Das innere Genitale dem Alter entsprechend entwickelt, ohne Veränderung.

Die Obduktion hatte also auch in diesem Falle zunächst kein Resultat im Sinne einer strikten Diagnosestellung ergeben und es mußte auch hier das Ergebnis der mikroskopischen Untersuchung des Gehirnes abgewartet werden.

Eine Verimpfung von Gehirnteilen auf Kaninchen, die gerade damals, ebenso wie die Verimpfung von Liquor von Patienten in Encephalitisfällen in größerem Maßstabe ausgeführt wurde, habe ich bei den in Rede stehenden 3 Fällen absichtlich unterlassen und zwar aus der Ueberlegung, daß die Resultate derartiger Tierimpfungen bei der langen nach dem Tode verstrichenen Zeit, zu welcher die Obduktionen stets erst vorgenommen werden konnten, sehr problematische gewesen wären.

Histologischer Befund.

Die mikroskopische Untersuchung der von Brückenteilen des Gehirnes der St. E. hergestellten Schnitte ergab in denselben eine ganz besonders stark ausgeprägte perivaskuläre Infiltration, aus Lymphozyten und Plasmazellen bestehend, und zwar fast um sämtliche getroffene Gefäße. Nebenbei war eine reichliche Blutfüllung der Gefäße zu konstatieren.

Der Befund entsprach also vollkommen dem der akuten Encephalitis epidemica v. Economo.

Gutachten.

Die Veränderungen, die bei der Obduktion der Leiche der St. E. gefunden wurden, sowie der histologische Befund, der an den von dieser Leiche entnommenen Gehirnstücken erhoben wurde, sprechen beide in der gleichen Weise für Encephalitis epidemica v. Economo. Gegen diese Auffassung sprechen auch nicht die klinischen Erscheinungen.

Ueber den fraglichen Zusammenhang mit der Blatternschutzimpfung sind Tierversuche mit dem eingeschickten Blatternimpfstoff im Gange, über die seinerzeit berichtet werden wird.

Es hatten also in diesem Falle die klinischen Symptome deutlicher für Encephalitis epidemica gesprochen, der anatomisch-histologische Befund ebenso wie in den ersten Fällen; doch waren wir durch diesen dritten Fall in bezug auf den Zusammenhang mit der Blatternschutzimpfung stutzig gemacht worden, und unser Gutachten sprach sich jetzt bezüglich dieses Zusammenhanges vorsichtiger und nicht mehr so dezidiert ablehnend aus wie in den beiden ersten Fällen.

Inzwischen war, wie schon erwähnt, der Rest des Impfstoffes, mit dem in P. die Vakzination vorgenommen worden war, uns zur Untersuchung übersandt worden. Dieser Impfstoff wurde zunächst der üblichen bakteriologischen Untersuchung unterworfen, und er erwies

sich dabei als im gewöhnlichen Sinne steril. Es wurden weiter zwei Kaninchen mit der Lymphe geimpft, und zwar das eine korneal, das andere kutan, indem auf die rasierte und skarifizierte Rückenhaut der Impfstoff eingerieben wurde. Das erste der Tiere zeigte die typische Vakzine-Keratoconjunctivitis, die nach 14 Tagen wieder ausgeheilt war. Das zweite Tier bekam an der Impfstelle eine konfluierende Kruste, die in gewöhnlicher Weise nach einigen Tagen abheilte. Außerdem fand sich bei ihm 13 Tage nach der Impfung eine 4 Tage dauernde Keratoconjunctivitis am rechten Auge, die es sich entweder durch Berührung der eigenen Impffläche oder durch Kontaktinfektion von dem ersten Tiere, mit dem es den Käfig teilte, zugezogen haben konnte. 28 Tage nach der Impfung waren beide Tiere ohne krankhaften Befund und wurden aus dem Versuch genommen. Ueber diese Befunde wurde dem Sanitäsdepartement berichtet, daß sich der Impfstoff in keiner Weise in bezug auf seine biologischen und tierpathogenen Eigenschaften als abnorm erwiesen habe, und die Ansicht ausgesprochen, daß auch in diesem 3. Falle ein ätiologischer Zusammenhang zwischen der Blatternschutzimpfung und der aufgetretenen Encephalitis nicht bestehe.

Tierversuche mit Vakzine.

Dadurch, daß ich im Herbst desselben Jahres mit der Arbeit von Levaditi und Nikolau über Neurovakzine bekannt wurde, drängte sich mir der Gedanke auf, ob nicht doch vielleicht in den genannten Fällen eine besondere Neutropie der verwendeten Lymphe bestanden habe, und ob man nicht der Blatternschutzimpfung in diesem konkreten Falle eine direkt ätiologische und nicht bloß eine auslösende Rolle für das Zustandekommen der Encephalitis zuzuschreiben hätte. Zu diesem Zwecke schien es mir am zweckmäßigsten, zu versuchen, ob es möglich wäre, bei Kaninchen, als den hierzu geeignetsten Versuchstieren, durch Applikation der Kuhpockenlymphe an einem vom Gehirn entfernten Orte Encephalitis hervorzurufen; denn es schien mir im Gegensatze zu den Ansichten von Levaditi und Nikolau außer Zweifel, daß die subdurale Injektion von Blatternimpfstoff bei Kaninchen eine Encephalitis hervorrufen müsse.

Es wurden daher im Herbste neuerlich Versuche in etwas größerem Ausmaße an Kaninchen ausgeführt. Zu den Versuchen wurden junge, etwa 2—3 Monate alte Tiere ausgesucht. Zunächst wurde der Rest der im Sommer eingesandten Lymphe benützt, später die jeweils frischesten Kapillaren, die zur Impfung im hiesigen Kinderspital vorrätig waren, verwendet, sämtlich aus der staatlichen Impfgewinnungsanstalt stammend.

Die Methode der kutanen Impfung, bei der die Veränderungen nicht immer gleich deutlich ausgeprägt waren, wurde im späteren Verlaufe der Untersuchungen zugunsten der kornealen Methode verlassen. Bei diesen korneal geimpften Kaninchen ergab sich nach ca. 30 Std. der typische Befund der Vakzinekeratokonjunktivitis, der sich bekanntlich in nichts von der durch das Herpes-Encephalitis-Virus erzeugten unterscheidet.

Als die Impfungen eine Zeitlang fortgeführt worden waren, stellte es sich heraus, daß ein großer Teil der so behandelten Tiere — etwa die Hälfte — nach einiger Zeit zugrunde ging. Die Tiere wurden nun, bevor sie eingingen, klinisch genauer beobachtet. Es traten aber bei ihnen keinerlei nervöse Symptome — etwa Manegebewegungen —, auf, wie sie bei den Herpes-Encephalitistieren zur Regel gehören. Dagegen war wohl hie und da stärkere Salivation bei ihnen zu beobachten, ohne daß zur selben Zeit bei anderen gesunden oder sonstwie infizierten Tieren unseres Stalles ähnliche Erscheinungen beobachtet worden wären. Der Tod dieser

Tiere trat im Durchschnitt am 8. oder 10. Tage nach der Impfung, nur bei zweien nach etwas längerem Zeitraume ein. Dieses Verhalten konnte ohne weiteres als in gewisser Beziehung mit den bei der Herpes-Encephalitisinfektion der Kaninchen auftretenden Erscheinungen parallel gehend erkannt werden.

Die anatomische Untersuchung der gefallenen Tiere ergab nicht immer dieselben Resultate. Was zunächst den Gehirnbefund anlangt, war auch dieser ein wechselnder, insofern Gehirn und Meningen meistens gerötet, in einzelnen Fällen aber auch blaß erschienen. Dabei schien die Dauer der Erkrankung keine Rolle zu spielen. Der übrige Körper wies in den meisten Fällen gar keine Veränderungen auf, selten zeigten sich geringgradige solche im Sinne von Marasmus.

Die histologische Untersuchung der Gehirne ergab in einzelnen Fällen ein negatives Resultat, in anderen (insbesondere bei deutlicher Hyperämie) ließen sich neben ausgedehnten, strotzend mit Blut gefüllten Gefäßen, wenn auch spärliche, doch deutliche perivaskuläre Rundzelleninfiltrate nachweisen.

Es stimmte also auch der anatomisch-histologische Befund mit dem nach der Infektion mit Herpes-Encephalitisvirus überein.

Impfungen mit dem Gehirn der so zugrunde gegangenen Tiere ergaben bei kornealer Applikation kein sicheres, bei subduraler Einverleibung gar kein Resultat.

Durch diese eben geschilderten Versuchsresultate war der Beweis erbracht, daß es gelingt, mit Vakzine bei Kaninchen, auch wenn nicht direkt in das Gehirn geimpft wird, eine tödliche Encephalitis zu erzeugen.

Außerdem hatten sich noch einige andere Tatsachen bei den eben besprochenen Versuchen feststellen lassen. Es war augenscheinlich auch eine spontane Uebertragung der Vakzine-Keratoconjunctivitis möglich. Ein solcher Fall war der schon oben bei der Besprechung der zwei erstgeimpften Tiere erwähnte; in einem zweiten blieben nach der Impfung die beiden Korneae eines Tieres 1 Woche lang reaktionslos, erst am 8. Tage konnte an dem einen Auge eine Reaktion festgestellt werden. Ein derartig langer Intervall wurde bei keinem Tiere beobachtet; da das in Rede stehende seinen Käfig mit einem zweiten teilte, welches am selben Tage geimpft worden war und 2 Tage darauf bereits eine korneale Reaktion gezeigt hatte, scheint mir die Annahme einer Kontaktinfektion viel Wahrscheinlichkeit für sich zu haben.

Ferner zeigte es sich, daß eine ergebnislose korneale Impfung gegen eine nach wenigen Tagen vorgenommene neuerliche Impfung nicht schützt. Dagegen wird die Kornea durch die überstandene Keratoconjunctivitis immun und bleibt es augenscheinlich wenigstens 2—3 Wochen. (Versuche nach einem längeren Zeitraume fanden nicht statt.)

Schon von vornherein war es mir selbstverständlich erschienen, daß die Blatternvakzine, die bei der Impfung am Menschen zu so deutlichen Veränderungen an der Haut, bei kornealer Applikation am Kaninchen aber zu jenen bekannten stürmischen Veränderungen führt, wenn man sie Kaninchen subdural beibringt, schwere Gehirnerscheinungen hervorrufen müsse. Daß es Levaditi und Nikolau im Gegensatze zu ihren Vorläufern (A. Marie, usw.) nicht gelungen war, Kaninchen auf diese Weise zu infizieren, erschien auffallend.

Nach den früher angegebenen Versuchsresultaten war die Richtigkeit dieser meiner Vermutung noch wahrscheinlicher geworden. Um aber über die Folgen dieses Infektionsmodus auch ein eigenes Urteil zu erhalten, wurde eine Reihe von Tieren mit unserer Vakzine durch subdurale Injektion infiziert.

Die zur Injektion bestimmte Lymphe wurde entsprechend unserer Annahme, daß sie sehr virulent sein müsse, zunächst auf das 100fache mit steriler, physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und von dieser Verdünnung wurde 2 Tieren je 1 ccm subdural injiziert. Die Tiere gingen beide am 6. Tage nach der Injektion zugrunde. Bei der Obduktion fand sich Rötung und Oedem des Gehirnes und seiner Häute, sonst am Körper keinerlei Veränderrungen. War die Konzentration der subdural verwendeten Lymphe eine stärkere, dann gingen die Tiere am 5. oder 4. Tage ein. Bei diesen trat einen halben Tag vor dem Tode Lähmung der Hinterhand ein. Mit den von diesen Tieren hergestellten Gehirnemulsionen konnte bei weiteren Kaninchen durch subdurale Injektion gleichfalls eine tödliche Encephalitis erzeugt werden. Ferner wurden von diesen Emulsionen erfolgreiche Uebertragungen auf die Cornea gesunder Tiere ausgeführt. Daß, wie oben erwähnt, weder die subdurale noch die korneale Uebertragung mit den Gehirnaufschwemmungen von den Tieren gelungen war, die an Encephalitis nach Keratoconjunctivitis zugrunde gegangen waren, war in diesen Fällen augenscheinlich darauf zurückzuführen, daß im Gehirn dieser Tiere viel zu wenig oder gar kein Virus mehr vorhanden gewesen war, um eine Infektion hervorrufen zu können.

Von der mit der Gehirnemulsion erzeugten Keratitis konnte dann wieder mit dem Erfolg subdural infiziert werden, daß die Tiere schon am 2. oder 3. Tage starben.

Die Gehirne derartiger an Vakzineencephalitis zugrunde gegangener Kaninchen erwiesen sich bei der gewöhnlichen bakteriologischen Untersuchung als steril, im Versuch aber als virulent.

So konnte z. B. folgende Serie durchgeführt werden:

Kan. u, subdural injiziert am 4. 2. mit $1^1/_2$ ccm 25facn verdünnter Lymphe; tot am 9. 2.

Kan. y, subdural injiziert am 9. 2. mit Gehirnemulsion von u; tot am 14. 2.

Kan. w, korneal injiziert am 14. 2. mit Gehirnemulsion von y; Reaktion am 16. 2.

Kan. n, s, z, korneal geimpft mit Konjunktivalflüssigkeit von w am 17. 2.; Reaktion am 19. 2.

Kan. Va 31, subdural geimpft mit Kornealeiter von w, s, n am 22. 2.; tot am 25. 2.

Kan. Va 32 und 33, korneal geimpft am 25. 2. mit Gehirnemulsion von 31; Reaktion bei beiden am 28. 2.

Um sich zu überzeugen, ob auch Vakzine anderer Herkunft dieselben Wirkungen äußerte, wurde mit einer Wiener Lymphe geimpft, die mir in liebenswürdigster Weise von Herrn Direktor Paul von der Wiener Impfstoffgewinnungsanstalt zur Verfügung gestellt wurde. Die Resultate waren dieselben, wie mit der hiesigen staatlichen, insofern auch bei der Wiener Vakzine bei 20facher Verdünnung eine tödliche Encephalitis nach subduraler Applikation erzielt wurde und von dem Gehirn dieser Tiere mit Erfolg korneale Impfungen vorgenommen werden konnten.

Was schließlich die anatomischen Veränderungen der Gehirne derjenigen Tiere anlangt, die nach subduraler Infektion zugrunde gegangen waren, boten dieselben bei Betrachtung mit freiem Auge meist bloß das Bild des Oedems; Hyperämie war nicht immer zu konstatieren. Die histologische Untersuchung ergab bei diesen Fällen die Veränderungen, wie sie durch die Beschreibungen von Luger und Lauda und von Zdansky bezüglich der Herpes-Encephalitisgehirnaffektion der Kaninchen bekannt sind. Sie waren entsprechend dem raschen Verlauf und der größeren Intensität der Affektionen viel stärker entwickelt als bei den nach kornealer Infektion zugrunde gegangenen Tieren. Sie bestanden vor allem in einer intensiven Meningoencephalitis, hervorgerufen durch Infiltration der Meningen und der Rindenanteile des Großhirnes mit den für das Kaninchen charakteristischen pseudoeosinophilen Leukozyten; es bestanden aber auch gleichzeitig schon perivaskuläre Infiltrate, besonders längst der von außen her eintretenden Gefäße, und diese Infiltrate waren aus Rundzellen zusammengesetzt. Während also die Leukozyten mehr die Randzonen des Gehirnes be-

setzten, waren die Rundzelleninfiltrate im Inneren gelegen. Was die Veränderungen der Parenchymzellen in diesen Gehirnen anlangt, so soll weiter unten noch derselben mit ein paar Worten Erwähnung getan werden.

Fasse ich die Resultate der mit Blatternvakzine angestellten Versuche zusammen, dann kann gesagt werden, daß es gelungen ist, bei kornealer Impfung mit der Lymphe eine in der Hälfte der Fälle tödlich verlaufende Encephalitis zu erzeugen; daß es ferner ohne weiteres möglich war, auch mit der stark verdünnten Lymphe bei subduraler Applikation eine gleichfalls tödliche, nur viel intensivere und rascher zum Tode führende Gehirnentzündung hervorzurufen. Ich befinde mich bezüglich der Resultate bei subduraler Impfung in Uebereinstimmung mit denen von Calmette und Guerin, sowie von A. Marie, über die ich schon vor Anstellung meiner Versuche orientiert war. Nach Fertigstellung meiner Untersuchungen wurde ich auch mit denen von Condrea und von Blanc u. Caminopetros bekannt, die bei derselben Methode zu denselben Resultaten gekommen waren. Nur zu den Versuchsergebnissen von Levaditi und Nikolau stehen meine Resultate in Widerspruch. Vielleicht war die von diesen Autoren in ihren Versuchen angewendete Lymphe überhaupt weniger virulent (bzw. neurotrop.).

Neu erscheint mir an meinen Versuchsresultaten, daß es bei kornealer Infektion der Kaninchen gelang, eine tödliche Encephalitis bei denselben zu erzeugen. Ich konnte in der mir zugänglichen Literatur nur in der Arbeit von Blanc und Caminopetros finden, daß von den korneal geimpften Tieren auch einzelne an Encephalitis zugrunde gegangen waren. Es besteht danach zwischen den beiden durch Vakzine- und durch Herpesencephalitis-Virus hervorgerufenen Affektionen außer der gleichen Veränderung an der Kaninchen-Kornea eine zweite Parallelität, nämlich das Auftreten von Encephalitis nach kornealer Applikation der beiden Virusarten. Die auf diese Art hervorgerufene Encephalitis endet bei beiden Affektionen in vielen Fällen tödlich, und zwar ungefähr in der gleichen Zeit. Diese Tatsache scheint mir für die Ueberlegungen, aus denen heraus meine Untersuchungen angestellt sind, von großer Bedeutung zu sein.

Bezüglich des Vorhandenseins des Vakzinevirus im Gehirne der korneal geimpften Tiere teilen Blanc u. Caminopetros, die bei den so behandelten Kaninchen stets Fieber feststellen konnten, mit, daß dasselbe dort ohne weiteres nachweisbar sei, aber nur solange das Fieber andauert, also etwa bis zum 4. Tage nach der Impfung. (Uebereinstimmung mit meinen negativen Resultaten bei der Verimpfung von Gehirnsubstanz der nach der kornealen Impfung erst am 8. Tage oder noch später eingegangenen Kaninchen.)

Weiter haben Plotz und andererseits Levaditi und Nikolau gezeigt, daß das Vakzinevirus (gleichgültig ob Dermo- oder Neurovakzine) im Gehirn von Kaninchen nachweisbar sei, die kutan geimpft worden waren. Dasselbe fanden Blanc u. Caminopetros nach Impfung in die Hoden. Eine Nachprüfung dieser letzteren Resultate schien sich mir bei der allgemeinen Uebereinstimmung zu erübrigen.

Aus allen diesen Erfahrungen geht demnach hervor, daß sich das Vakzinevirus, gleichgültig, von welchem Orte es eingeführt wird, beim Kaninchen im Gehirn in

virulenter Form nachweisen läßt und dort entzündliche Veränderungen hervorruft (perivaskuläre Infiltrate bei einer Anzahl der zugrunde gegangenen Tiere). Ich glaube, es besteht kein Zweifel, daß auch beim Menschen eine allgemeine Propagation des Virus im Körper erfolge; wir fassen ja auch die nach der Vakzinierung auftretende Immunität als eine solche des ganzen Körpers und nicht bloß als eine auf die Haut beschränkte auf. So muß man wohl annehmen, daß auch beim Menschen das Virus in das Gehirn gelangt. Ob und inwieweit das Zentralnervensystem des Menschen durch dieses eingedrungene Virus geschädigt wird, bzw. ob nach jeder Schutzpockenimpfung am Zentralnervensystem entzündliche Veränderungen auftreten, so wie sie bei Kaninchen gefunden werden, darüber liegen Untersuchungen zurzeit nicht vor[1]). Es besteht aber, glaube ich, kein Grund, der gegen die Annahme, daß ein solches Vorkommen zum mindesten möglich sei, sprechen würde.

Epidemiologische Daten.

Von Interesse erschienen auch die bei unseren Fällen obwaltenden epidemiologischen Verhältnisse.

Schon zur Zeit der Vornahme der Obduktionen wurde festgestellt, daß in der letzten Zeit in der genannten Gegend keine Fälle von Encephalitis vorgekommen seien, sondern daß die letzten Fälle im Januar des betreffenden Jahres beobachtet worden waren. Nachträglich wurden mir von seiten des Sanitätsdepartements durch freundliche Vermittlung des Herrn San.-Inspektors Ziel die Daten zur Verfügung gestellt, die in beifolgender Tabelle vereinigt sind. Aus dieser ist ersichtlich, daß in der Stadt Tr. das ganze Jahr, außer den 2 von mir obduzierten, kein Fall von Encephalitis oder Poliomyelitis[2]) gemeldet worden ist, im Dorfe P. seit der zweiten Januarhälfte, zu welcher Zeit ein Fall gemeldet war, kein anderer außer dem von mir obduzierten festgestellt wurde. Im Nachbarbezirke Nachod war im Winter eine größere Epidemie aufgetreten, die sich auf die angrenzenden Orte Eipel und Hertin des Bezirkes Tr. erstreckte.

Damit würden die 3 von mir untersuchten Fälle verhältnismäßig isoliert dastehen, was bei der Beurteilung ihrer Aetiologie gewiß auch von Wichtigkeit wäre.

Berücksichtigt man die Ergebnisse der mit dem Impfstoffe vorgenommenen Tierversuche, die insofern eine Neuheit ergaben, als eine tödliche Vakzineencephalitis nach kornealer, also nach einer von einem anderen Orte aus bewirkten Infektion eintrat, was bis jetzt nicht bekannt war, berücksichtigt man ferner, daß die genannten 3 Fälle in epidemiologischer Hinsicht ziemlich isoliert dastanden, dann scheint es nicht weiter verwunderlich, daß für unsere 3 Fälle die Blatternschutzimpfung nicht mehr bloß als auslösendes Moment, wie dies natürlich zunächst geschehen war, in Betracht gezogen wurde, sondern der Gedanke an ätiologische Beziehungen zwischen Vakzinevirus und Encephalitis auftauchen mußte.

Als Unterstützung für diesen Gedankengang könnte vielleicht auch noch folgender Umstand angeführt werden. Während sonst in den

1) Diesbezügliche Untersuchungen sind nunmehr bereits im Gange.
2) Herr Prof. Langer gibt allerdings an, bei seiner oben erwähnten Anwesenheit in Tr. einen Fall von Poliomyelitis, dessen Erkrankung im Februar 1923 begonnen hatte, gesehen zu haben.

Krankengeschichten der Encephalitisfälle stets über ein katarrhalisches Stadium berichtet wird, war in unseren Fällen von einem solchen keine Rede. In den Aufzeichnungen über den Krankheitsverlauf bei den genannten Kindern, die ich der Freundlichkeit des Herrn Prof. Langer verdanke, ist von katarrhalischen Erscheinungen nichts angegeben; bei den 2 ersten Kindern begann die Krankheit mit Erscheinungen von seiten des Gehirnes (Trismus und Opisthotonus), im 3. Fall mit Fieber und Kopfschmerzen, zu denen sich dann noch Schielen gesellte.

Die oben erwähnte Vermutung des ätiologischen Zusammenhanges zwischen Blatternschutzimpfung und Encephalitis zeitigte begreiflicherweise den Wunsch, Beweise in einer oder der anderen Richtung zu erbringen. Der beste in dieser Richtung wäre natürlich durch eine Tierimpfung vom Gehirne der Kindesleichen gleich bei der Sektion zu erbringen gewesen. Damals wurde aber, wie schon oben erwähnt, von einer solchen abgesehen, weil mir die zwischen Tod und Obduktion verstrichene Zeit zu lange erschien, als daß ein Erfolg von der Impfung zu erwarten gewesen wäre. Hätte ich damals schon die Erfahrungen bezüglich der Uebertragung der Vakzineencephalitis auf die Kaninchenkornea gehabt, dann hätte ich wahrscheinlich wenigstens diese trotz des langen Intervalles vorgenommen. Da dies nun aber versäumt worden war, blieb nichts übrig, als sich an das noch vorhandene Material zu

Encephalitis epidemica im Jahre 1923.

Datum	Bezirk Braunau			Bezirk Nachod			Bezirk Trautenau		
		erkr.	gest.		erkr.	gest.		erkr.	gest.
1.–15. 1.	—	—	—	Kramolna	1	—	—	—	—
16.–31. 1.	Plitz	1	—	Nachod	2	1	Eipel	1	—
	Zdar	1	1	Babi	1	—	Parschnitz	1	1
				Beloves	1	1			
				Dobosov	1	—			
				Hronov	1	1			
				Kramolna	1	—			
				Rokytnik	1	—			
				Gr.-Parschnitz	4	—			
				Zbecnik	2	2			
1.–15. 2.	.	.	.	Nachod	1	—			
				Böhm. Skalitz	1	1			
				Ob.-Kosteletz	1	1			
				Kramolna	1	1			
				Gr.-Parschnitz	1	11			
				Rokytnik	1	1			
16.–29. 2.	.	.	.	Nachod	1	—	Batnovice	1	—
				Hostinka	1	1	Eipel	7	2
				Chlistov	1	1			
				Altstadt a. M.	1	—			
1.–15. 3.	.	.	.	Ob.-Kosteletz	1	—	Hertin	1	—
							Kl.-Schwansdorf	1	—
16.–31. 3.	Politz	1	—	Ob.-Kosteletz	1	1	Hertin	1	1
1.–15. 5.	Studena	1	—	—	—	—	—	—	—
1.–15. 6.	—	—	—	—	—	—	Trautenau	2	2
							Parschnitz	1	1
16.–30. 6.	Studena	1	1	—	—	—	—	—	—
1.–15.12.	—	—	—	—	—	—	Schatzlar	1	1

Poliomyelitis anterior.

1.–12.		0	0		0	0		0	0

halten. Fürs erste schien es mir nicht uninteressant, vergleichende Untersuchungen über die Veränderungen anzustellen, die die beiden Virusarten, Vakzine einerseits und Herpesencephalitis andererseits, an der Kaninchenkornea hervorriefen, an der sich die makroskopischen Befunde so sehr ähneln. Zweitens sollte nachgesucht werden, ob sich bei der Kaninchenvakzine-Encephalitis etwa Zellenveränderungen im Sinne von Guarneri-Körperchen in Analogie zu den Herpeskörperchen bei der Herpesencephalitis dieser Tiere finden ließen. Und schließlich, wenn das etwa der Fall gewesen wäre, sollten die von den Kindern stammenden Gehirne in derselben Richtung untersucht werden. Wenn es möglich wäre, in den Gehirnen von Tieren nach Vakzineinfektion charakteristische Veränderungen zu finden, wie die, welche für Herpesencephalitis zurzeit als pathognomonisch angesehen werden, dann hätte natürlich der Nachweis derselben Veränderungen in den Gehirnen unserer Fälle die Diagnose mit Bestimmtheit zu stellen erlaubt.

Einschlüsse.

Die beiden, durch Kuhpockenlymphe einerseits und durch das Herpesencephalitisvirus andererseits hervorgerufenen Affektionen der Hornhaut des Kaninchens zeigen eine so weitgehende grobanatomische und klinische Uebereinstimmung, daß sie durch die eben genannten Methoden nicht voneinander unterschieden werden könnten. Die Unterscheidung erfolgt am sichersten durch die histologische Untersuchung, d. h. in Schnittpräparaten; in diesen werden schon bei den gewöhnlichen Färbemethoden die für die ersteren charakteristischen, im allgemeinen im Protoplasma gelegenen Guarnerischen Körperchen, im anderen Falle aber die von Lipschütz bzw. Luger u. Lauda beschriebenen Herpeskörperchen sichtbar, und dadurch die Diagnose festgestellt. Allerdings hat Löwenstein seinerzeit in Abstrichen von Kaninchenaugen, welche mit Herpeskeratitis behaftet waren, Gebilde beschrieben, die im Protoplasma intakter Kornealzellen lagen, und für die er die Möglichkeit offen ließ, daß man es bei ihnen mit eingedrungenem Virus und den Reaktionsprodukten der Epithelzellen zu tun habe. Sie werden von ihm beschrieben als: „Körnchen von blau-schwarzer Farbe (May-Grünwald-Giemsa-Färbung). Doppelkokken, welche typisch gefärbte Höfe aufweisen, manchmal Kappen, welche aus allerfeinsten und gröberen Körnchen zusammengesetzt sind und größtenteils dem Kern anliegen (vielfach sehen wir Ausbuchtungen am Kern).“ In Schnitten aber hat Löwenstein, „wie zu erwarten war, nichts von diesen feinen Veränderungen“ gefunden, deren Deutung er offen läßt.

Meine Untersuchungen beziehen sich ausschließlich auf Schnittpräparate.

Den 2- oder 3mal 24 Std. nach der kornealen Impfung getöteten Kaninchen wurden die Augen herausgenommen und in toto auf 24 Std. in Sublimatalkohol eingelegt, sodann die Hornhaut isoliert, zugeschnitten und nach den bei dieser Fixierung noch vorgeschriebenen Prozeduren in Paraffin eingebettet. Die Schnitte wurden möglichst dünn angefertigt (2—3 μ) und nach den im Folgenden angegebenen Methoden gefärbt.

Bei Anwendung von Hämalaun-Eosin nahmen sowohl Guarneri- (G.K.) wie Herpeskörperchen (H.K.) die rote Farbe an, und zwar zeigten beide denselben schmutzigroten Ton; die Färbung nach van Gieson ließ beide Gebilde im selben graugelblichen Farbton erscheinen. In den Schnitten, die nach der Methode von Biondi-Heidenhain behandelt waren, erschienen sowohl G.K. als auch die H.K. rot, und zwar so ziemlich in der gleichen Intensität. (Die G.K. sollen sich eigentlich nach dieser Methode blau färben; ich konnte das aber in meinen Prä-

parateu nicht sehen; es erschienen bei dieser Methode auch die Chromosomen der in Teilung begriffenen Zellen einmal blau und dann wieder rot. Dieses Verhalten steht übrigens in Uebereinstimmung mit den Angaben Schmorls, der diese Färbemethode als sehr launenhaft bezeichnet.) Wurden die Schnitte nach Mallory gefärbt, dann zeigte sich an den G.K. stets eine ausgesprochene Gelbfärbung; die Färbung der H.K. war eine verschiedene, es zeigten sich die mannigfaltigsten Uebergänge von blaugrau zu gelblich; diese Nuancierung konnte mehr oder weniger willkürlich erzeugt werden, je nachdem man länger oder kürzer mit Säurefuchsin vorbehandelte oder länger mit dem Farbengemisch nachfärbte (siehe Fig. 1 u. 8, Taf. I). Doch fanden sich in den Präparaten neben den bläulich gefärbten H.K. stets auch in einzelnen Kernen „Einschlüsse", die genau so intensiv gelb gefärbt waren wie die G.K. (siehe Fig. 1, Taf. I). Die außerhalb des Kernes gelegenen Gebilde, auf die weiter unten noch eingegangen werden wird, erschienen stets in sattgelber Farbe. Auch bei der Färbung nach Lentz, bei der die G.K. stets leuchtend rot erscheinen, zeigten sich in den von der Herpesaffektion stammenden Schnitten neben blaßrosa Kerneinschlüssen auch leuchtend rote kleinere (siehe Fig. 2, Taf. I). Bei Behandlung der Schnitte mit Giemsa-Farbstoff färbten sich die beiden Arten von Körperchen stets in derselben Farbe, es konnte aber stets nur ein blauer Ton erzeugt werden, die Chromosomen der Teilungsfiguren erschienen schwarzblau.

Bei diesen vergleichenden Untersuchungen zeigte sich demnach eine ziemlich weitgehende Uebereinstimmung der G.K. und H.K. bezüglich ihres Verhaltens gegenüber den verschiedenen Farbstoffen bzw. Färbeverfahren; diese Uebereinstimmung war eine vollkommene bei Anwendung von Hämalaun-Eosin, des van Gieson-Gemisches, des Heidenhainschen- und des Giemsa-Farbstoffes; bei der Färbung nach Lentz zeigte sich insofern ein kleiner Unterschied, als sich die H.K. zwar stets auch azidophil erwiesen, aber im allgemeinen weniger intensiv gefärbt erschienen als die G.K. Bei der Mallory-Färbung ergab sich ebenso wie bei der Lentz-Färbung ein Unterschied zwischen den H.K. und G.K., da die letzteren sich stets azidophil erwiesen, die H.K. aber meist schwach basophil. Doch waren sowohl bei der Lentz- als auch bei der Mallory-Färbung in den Herpes-Präparaten stets auch stark azidophile kleinere Gebilde in verschiedener Zahl und Lagerung nachzuweisen.

In zweiter Linie schienen mir Befunde, die ich bei diesen Untersuchungen erheben konnte, bemerkenswert: sie bestanden darin, daß gelegentlich in den Vakzinepräparaten den G.K. analoge Gebilde auch innerhalb des Kernes gefunden wurden und andererseits in den Herpesschnitten „Einschlüsse" im Protoplasma.

Die erstere Tatsache, daß gelegentlich G.K. auch im Kerne vorkommen, ist beschrieben; so gibt Prowazek im Handbuch der path. Protozoen im Kapitel über Vakzine von den G.K. folgendes an: „Die Körperchen kommen hauptsächlich im Protoplasma vor und dellen den Kern oft ein. Gorini, Bosc, Councilman, Margrath und Brinckendorff beobachteten sie auch im Kern. Als seltenen Befund habe ich ... Vakzinekörperchen im Kern abgebildet" (siehe diesbezüglich auch Neumann u. M. Mayer, Tierische Parasiten. Taf. 32, Fig. 3). Ich möchte zu diesen Erscheinungen gleichfalls einen Beitrag liefern; es ist dementsprechend in Fig. 3, Taf. I eine Stelle aus einem Schnitt durch eine mit Vakzine geimpfte Cornea wiedergegeben; die Färbung war nach Lentz vorgenommen worden, und man sieht in 2 Zellkernen rote, den außerhalb der Kerne liegenden G.K. färberisch vollkommen analoge Gebilde.

Das zweite Vorkommnis, nämlich das Auftreten von Körperchen im Protoplasma der Zellen bei der Herpeskeratitis, habe ich nicht beschrieben gefunden. Ich bringe deshalb einige Figuren, welche diese Verhältnisse illustrieren sollen. In Fig. 2 war bereits eine Zelle wiedergegeben, in der ein intensiv rot gefärbtes Körperchen sich außerhalb des Kernes befindet. Fig. 4, Taf. I zeigt eine Zelle, die in Kern und Plasma eine ganze Anzahl tropfenförmiger roter Gebilde aufweist. In Fig. 5 ist wiederum aus einem Schnitte von einer Herpeskeratitis ein Gebilde dar-

gestellt, das allen Anforderungen, die an ein G.K. gestellt werden können, entspricht; es liegt im Protoplasma, es ist acidophil (Mallory-Färbung!), und es buchtet den Kern ein, die Nukleolen der dargestellten Zellen zeigen dieselbe Tinktion. Aehnliche Verhältnisse finden sich in den Fig. 6, 7, 8, Taf. I. Speziell in Fig. 7 sind Veränderungen wiedergegeben, die eine weitgehende Aehnlichkeit mit den in Vakzineläsionen auftretenden zeigen, wie sie z. B. im Atlas von Neumann u. M. Mayer Taf. 32, Fig. 5 dargestellt sind. Solche Bilder könnten noch wiederholt werden; sie sind alle den Zentren der Läsionsstellen der Herpeskeratitis entnommen, an welchen Stellen sich so veränderte Zellen meist in mehreren Exemplaren fanden.

Aus diesen Bildern ergibt sich demnach, daß auch bei der Herpeskeratitis des Kaninchens in den Kornealzellen Veränderungen zu finden sind, die denen bei der Vakzinekeratitis analog sind.

Lipschütz gibt an, daß auch bei der von ihm als Paravakzine beschriebenen Affektion „Einschlüsse" sowohl im Kern wie im Protoplasma zu sehen sind. Daß die als Herpeskörperchen beschriebenen Gebilde auch schon bei anderen Affektionen früher beobachtet worden sind, zeigt wiederum eine Abbildung in Neumann-Mayer, Taf. 32, Fig. 2. Es handelt sich dort um einen Schnitt durch die Leber eines an Blattern zugrunde gegangenen Negers, es wird aber dort von den Kernveränderungen weiter kein Aufheben gemacht.

Als Ergebnis meiner Vergleichsuntersuchungen betreffend die Vakzine- und die Herpeskeratitis möchte ich demnach zusammenfassen: Die bei den beiden Affektionen bisher beschriebenen Körperchen verhalten sich bei den gewöhnlichen Färbemethoden gleich, bei der Lentz- und bei der Mallory-Methode aber bleiben die H.K. in bezug auf Azidität hinter den G.K. zurück. Es finden sich aber bei den Herpesveränderungen auch solche „Einschlüsse", die in bezug auf Azidophilie den G.K. nichts nachgeben. Diese stärker azidophilen Körperchen finden sich nicht bloß im Kern, wie die bisher beschriebenen Herpeskörper, sondern auch im Protoplasma der betreffenden Zellen, entsprechen also auch in dieser Beziehung den G.K. Diesen Befund möchte ich als etwas Neues hinstellen, und ich sehe in ihm einen weiteren Beleg für die nahe Beziehung der beiden in Rede stehenden Affektionen, welche Beziehungen sich also nicht bloß auf das grobanatomische und das klinische Verhalten, sondern auch auf die Zellveränderungen erstrecken.

Es ist nicht unmöglich, daß die von den Autoren beschriebenen H.K. allmählich in die von mir beschriebenen übergehen können, „ausreifen", wenn man will. Das könnte durch Aufnahme gewisser Substanzen (siehe weiter unten!) geschehen. Auf jeden Fall aber waren im Protoplasma der Zellen nur diese „ausgereiften" Gebilde nachweisbar, niemals solche vom Verhalten der H.K. der Autoren. Man könnte annehmen, daß erst diese ausgereiften Formen aus dem Kern austreten, aber ein Beweis dagegen, daß sie nicht auch von vornherein im Plasma entstehen könnten, ist nicht vorhanden.

Um mir ein Urteil über das Wesen bzw. die Zusammensetzung der in Rede stehenden Gebilde zu verschaffen, schien es mir vorteilhaft, andere ähnliche Veränderungen zu vergleichenden Untersuchungen heranzuziehen. Diesbezüglich erschienen einerseits die Negrischen Körperchen, die allseitig als für die Wut charakteristisch anerkannt sind, als geeignetes Vergleichsobjekt, andererseits war es nicht uninteressant, die bei der Encephalitis epidemica von verschiedenen Seiten gemachten Befunde in den Kreis dieser Untersuchungen zu ziehen, bzw. dieselben zu revidieren. Bezüglich dieser bei der Encephalitis epidemica vorkommenden sog. Einschlüsse habe ich mich in einer früheren Publikation auf den Standpunkt gestellt, daß es sich wohl nur um uncharakteristische

Degenerationserscheinungen handeln dürfte, da ich sie bei den verschiedensten Erkrankungen in ganz annaloger Weise fand.

Die Negrischen Körperchen (N.K.) lassen sich sowohl nach Formalin- wie nach Alkohol- oder Sublimatfixierung darstellen. Bei der Färbung mit Hämatoxylin-Eosin sind sie als blaßbläuliche homogene Körper sichtbar (der Nucleolus erscheint dunkelblau), nach der Behandlung mit dem Gemisch van Giesons erscheinen sie intensiv gelb (der Nucleolus rotbraun); färbt man nach Biondi-Heidenhain, dann sind die N.K. homogen braunrot, ebenso wie der Nucleolus, die Ganglienzellen erscheinen schmutzigrot, die Kerne der Gliazellen blaugrün, die roten Blutkörperchen leuchtend rot. Bei allen diesen Färbungsmethoden können in den N.K., ebenso wie im Nucleolus, kleine ungefärbte Vakuolen sichtbar sein. Im Kern finden sich meist mehrere kleinere, rundliche Gebilde neben dem Nucleolus, von derselben Farbe wie dieser. (Siehe unten dieselben bei Encephalitis epidemica.) Behandelt man die Schnitte nach der Methode von Mallory, dann erscheinen die N.K. leuchtend gelb, ebenso wie der Nucleolus, die roten Blutkörperchen mehr orange. Auch bei dieser Methode sind in den Kernen kleinere, runde gelbe Gebilde nachweisbar, und ebensolche auch im Protoplasma. Die N.K. lassen, wenn die Färbung intensiv ist, schwarze Innenkörperchen (wie bei der Lentzschen Methode mit Jod und bei der Stutzerschen) erkennen; ist die Vorfärbung mit Säurefuchsin nicht sehr stark gewesen, dann haben die N.K. einen mehr graubläulichen Ton (siehe oben Herpeskörperchen). Die Mallory-Färbung scheint mir zur Darstellung der N.K. ganz besonders geeignet, und sei dieselbe wegen der besonders schönen Kontraste, der Leichtigkeit der Durchführung und der langen Haltbarkeit zu diesem Zwecke ganz besonders empfohlen.

Die Lentzsche Färbung stellt die N.K. bekanntlich rot dar, den Nucleolus violett, die roten Blutkörperchen orange. Bei Einfügen von Jod in die Färbeprozedur erscheinen in den N.K. dunkelblaue Innenkörper. Diese Innenkörper lassen sich am schönsten mit der Methode von Stutzer darstellen, wobei die Grundfarbe des Gewebes blau ist, die N.K. violett mit dunkelvioletten Innenteilchen.

Zum Vergleich wurden die G.K. und H.K. gleichfalls nach Stutzer gefärbt. Es zeigten dabei die G.K. ganz dasselbe Verhalten wie die N.K., auch in ihrem Inneren wurden punktförmige dunkelviolette Gebilde sichtbar; die H.K. hingegen zeigten keine von der Umgebung differente Färbung, sie erschienen ebenso wie diese blau, doch waren in den lädierten Stellen der Kornea bei der Herpesaffektion stets auch Zellen zu finden, die in Kern und Protoplasma tief violett gefärbte, tropfenförmige Gebilde erkennen ließen, welche den in den Figg. 4, 5, 6, 7 und 8 dargestellten, nach Lentz intensiv rot und nach Mallory intensiv gelb gefärbten entsprachen.

Bei Giemsa-Färbung erschienen die N.K. blaßbläulich mit dunkleren und mehr violetten Innenkörpern, der Nucleolus erschien in derselben Farbe, vielleicht etwas dunkler, die roten Blutkörperchen waren in der gleichen Farbe und der gleichen Intensität wie die N.K. tingiert.

Sehr schöne Bilder gibt bezüglich der N.K. die Färbung mit Methylgrün-Pyronin nach Unna-Pappenheim, insbesondere wenn sie etwas länger und im Brutschrank durchgeführt wird. Die genannten Gebilde erscheinen bei dieser Gelegenheit als lila bzw. blaue Scheiben mit roten, sehr schön ausgeprägten Innenkörpern (siehe Fig. 9, Taf. I; der Leib der Ganglienzellen erscheint dabei schmutzigrot, die Nucleoli braunrot bis lila, die roten Blutkörperchen stets lila). Es erschien von Interesse, zu sehen, wie sich bei dieser Färbung die G.K. und H.K. verhalten würden. Der Effekt ist in den Figg. 10 und 11 auf Taf. I wiedergegeben. Man sieht an diesen, daß die G.K. sich vollkommen analog den N.K. verhalten, sie sind blau bzw. lila gefärbt, und es finden sich unter ihnen viele, die eingesprengte rote Pünktchen aufweisen. Die H.K. erscheinen nicht different gefärbt, sondern wie die Umgebung bläulichrot, aber in den Herpespräparaten finden sich stets Zellen mit kleineren, den G.K. analogen Gebilden in- und außerhalb der Kerne, welche dieselbe Grundfarbe aufweisen wie die G.K., sie erscheinen nämlich homogen lilablau.

Die Färbung mit Methylgrün-Pyronin zeigt demnach in ganz besonders schöner Weise eine Beziehung oder Verwandtschaft der N.K., der G.K. und gewisser, bei der Herpeskeratitis vorkommender Gebilde, während die von den Autoren beschriebenen H.K. ebenso wie bei der Stutzer-Färbung nur den Grundton der Farbe annahmen, sich also verschieden von den drei genannten Gebilden erwiesen.

Der Vergleich zwischen den N.K. einerseits und den G.K., sowie den von mir bei der Herpesaffektion der Kaninchenkornea gefundenen

Gebilden andererseits ergab also, zusammengefaßt, eine vollkommene Uebereinstimmung der 3 genannten Gebilde in färberischer Beziehung. Dagegen war ein weitgehender Unterschied zwischen den N.K. und den von den Autoren beschriebenen H.K. zu bemerken, insofern als diese letzteren sich bei den Färbungen nach Stutzer und Unna-Pappenheim vollkommen verschieden von den N.K. färbten, nämlich bei der ersteren Methode blau wie der übrige Grundton und bei der zweiten ebenso wie der Grundton braunrot. Aus diesem färberischen Verhalten kann, glaube ich, auf eine Verwandtschaft zwischen den N.K., G.K. und gewissen Gebilden beim Herpes bezüglich des stofflichen Aufbaues geschlossen werden, welche Verwandtschaft für die von den Autoren beschriebenen H.K. nicht besteht.

Ueber die bei der Encephalitis epidemica gefundenen Zellveränderungen habe ich in einer früheren Mitteilung berichtet.

Ich konnte damals dreierlei Gebilde unterscheiden: 1) solche, die im Kern der pigmentierten Ganglienzellen auftraten (Substantia nigra, Locus coeruleus), 2) solche, die im Plasma dieser selben Zellen lagen, und 3) solche, die sich im Plasma anderer Nervenzellen fanden (besonders in der Schleife). Die Gebilde der 1. Kategorie waren bei allen Fixierungs- und Färbemethoden sichtbar. Sie erschienen als runde Gebilde, etwas kleiner als der Nucleolus, in Ein- oder Mehrzahl. Bei Hämalaun-Eosinfärbung zeigten sie einen gelblichen oder bräunlichen Farbton, oder sie waren violett gefärbt wie der Nucleolus; bei der Lentzschen Färbung erschienen sie rosa oder etwas dunkler gefärbt, nach der Stutzerschen gelb oder braun (Nucleolus blau). 2) Die im Protoplasma der pigmentierten Nervenzellen auftretenden Körperchen waren nur bei der Färbung nach Lentz als leuchtend rote, runde Gebilde, etwas größer als die Pigmentkörner, sichtbar gewesen. Ich hatte sie damals als ungefärbte Vorstufen des Pigmentes aufgefaßt. Die 3. Art der „Einschlüsse" endlich fand sich hauptsächlich in Ganglienzellen der Schleife. Sie bestanden aus größeren Tropfen und waren, besonders bei der Stutzer-Färbung, durch ihr leuchtendes Violett und die im Inneren auftretenden Körperchen aufgefallen; sie erinnerten durch dieses Verhalten sehr an die N.K. Sie ließen sich in formalinfixiertem Material nach der Vorschrift für die Tuberkelbazillenfärbung im Schnitt sehr schön darstellen und in Gefrierschnitten mit Sudan färben. Diese Gebilde können also nach dem Ausfall der letztgenannten Reaktion ohne weiteres als Fetttropfen angesehen werden, und der Prozeß als fettige Degeneration der betreffenden Zellen. Interessant war das Auftreten der kleinen Körperchen innerhalb der Fetttropfen. Ich habe bis jetzt nur in einer Abhandlung von Anitschkoff (Aschoff) über tropfige Entmischung ein Analogon dazu gefunden; auch dieser fand in protoplasmatischen Tropfen kleinere „intragranuläre" Körperchen. Er erhob seine Befunde an Leberzellen von Kaltblütlern, welche Zellen in vitro mit hypotonischer Kochsalzlösung behandelt worden waren. Anitschkoff faßte die bei der tropfigen Entmischung auftretenden protoplasmatischen Tropfen als veränderte Zellgranula (Mitochondrien) auf, die auch Lipoide enthalten. Ich hatte alle diese Befunde damals unabhängig von Herzog und Mittasch, die ähnliche beschrieben haben, erhoben. Auf Grund von Vergleichsuntersuchungen habe ich seinerzeit alle diese 3 Formen von „Einschlüssen" als unspezifische Stoffwechsel- oder Degenerationsprodukte angesprochen; sie fanden sich nämlich auch in Gehirnen von Personen, die an anderen Krankheiten als der Encephalitis epidemica zugrunde gegangen waren.

In Fortsetzung der Vergleichsuntersuchungen wurden jetzt Gehirnschnitte von Fällen von E. e. und anderer Provenienz der Mallory- und Unna-Pappenheim-Färbung unterzogen. Bei der Färbung nach Mallory erschienen 1) die Körperchen im Kern der pigmentierten Ganglienzellen in verschiedener Farbe dargestellt, nämlich blaugrau, bzw. in verschiedenen Zwischenstufen von diesem bis zu Gelb, 2) die im Plasma der pigmentierten Nervenzellen auftretenden waren stets deutlich gelb gefärbt und erschienen teils kleiner, teils größer als die Pigmentkörner. Sie waren in den Fällen von E. e. in den Substantia nigra-Zellen etwas reichlicher vorhanden als in den Kontrollfällen, was mit der schweren Läsion dieser Zellen bei der E. e. gut vereinbar wäre. Was die 3. Art von Veränderungen anbelangt, die augenscheinlich der „Pigmentatrophie" Spielmeyers entspricht, so zeigten sich in der Schleife bei Mallory-Färbung die oben genannten Gebilde in gelbem Ton.

Besonders interessant erschienen die Verhältnisse bei der vergleichenden Untersuchung mit der Methode von Unna-Pappenheim. In derartig behandelten Schnitten erschienen die im Kern auftretenden Gebilde gelblich bis dunkelbraun, also unspezifisch gefärbt (der Nucleolus meist lila), die neben dem Pigment im Plasma liegenden Tropfen waren deutlich blau (siehe Fig. 12, Taf. I, um zu zeigen, daß die Färbung nach Vorschrift ausgefallen war, sind 2 Plasmazellen aus demselben Schnitt dazugezeichnet). Das vorher genannte Blau entspricht vollkommen der Grundfarbe der N.K., G.K. und der von mir bei Herpes oben beschriebenen Körperchen (siehe diesbezüglich Fig. 9, 10, 11). Besonders eigenartig erscheinen die im Plasma der Zellen der Schleife festgestellten Lipoidtropfen; sie zeigen nämlich jeder einzelne einen hellen Hof und in der Mitte ein ebenso blau wie die ebenerwähnten Gebilde gefärbtes Körperchen (siehe Fig. 13). (Bei den in Formalin fixierten Präparaten war der helle Hof schmäler und der blaue Innenkörper größer als bei den in Alkohol fixierten.) Dieses Verhalten erinnert sehr an das in meiner Mitteilung über „Einschlüsse“ bei Stutzer-Färbung dargestellte, ganz genau aber deckt es sich mit den Bildern, die da Fano in seiner vorläufigen Mitteilung auf S. 2 und 3 von den „minute bodies“ gibt.

Wenn aus dem färberischen Verhalten ein Schluß auf die Zusammensetzung gezogen werden darf, dann bestehen alle diese sich blau färbenden Gebilde, die N.K., G.K. und die von mir beim Herpes beschriebenen Körperchen aus lipoiden Substanzen, ebenso wie die Tropfen in den Ganglienzellen der Schleife, die sich ja mit Sudan färben ließen und die Tropfen im Plasma der pigmentierten Nervenzellen der S. n. Bezüglich dieser letzteren war die rote Tinktion bei der Lentz-Färbung (Analogie mit N.K. usw.) schon oben angegeben worden, hier aber sei noch hinzugefügt, daß sie sich in Gefrierschnitten mit Scharlachfarbstoff rot darstellen ließen. Damit war auch für sie die Lipoidnatur erwiesen. Es war also nur noch nachzusehen, ob sich die Lipoidtropfen in den Zellen der Schleife nach Lentz färben lassen. Bei Anwendung dieser Methode zeigte es sich, daß in den Lipoidtropfen ebenso große rote Körperchen auftraten, wie bei der Methylengrün-Pyroninfärbung blaue (siehe Fig. 14, Taf. I, an einer Stelle der gelbe Pigmenthaufen der Pigmentatrophie).

Schließlich wurden noch die N.K. als Vertreter der in Rede stehenden „Einschlüsse“ Fettfärbungen unterzogen. Sie erwiesen sich bei der Methode der Tuberkelbazillenfärbung für Schnitte als säurefest, mit Sudan im Gefrierschnitt aber ließen sie sich nicht färben. Es würde aus diesem Verhalten hervorgehen, daß die genannten Gebilde tatsächlich so wie die sich bei der Unna-Pappenheim-Methode auch blau färbenden Degenerationsprodukte aus einer lipoiden Substanz aufgebaut sind, wenn auch nicht aus einer mit Sudan färbbaren. Bei der Behandlung der Gefrierschnitte mit Sudan konnte festgestellt werden, daß die Ganglienzellen des Ammonshornes, insbesondere des Menschen, bei Lyssa durchaus nicht von Degenerationserscheinungen frei sind, wie v. Prowazek z. B. angibt, sondern daß sie das Bild schwerer fettiger Degeneration darbieten.

Aus den Vergleichsuntersuchungen zwischen den bei der Encephalitis epidemica vorkommenden Gebilden und den bei Lyssa, Vakzine und Herpes auftretenden geht zunächst für die im Kern der Ganglienzellen bei Encephalitis epidemica gefundenen und schon früher als nicht spezifisch erkannten hervor, daß sie sich auch färberisch von den N.K. und G.K. unterschieden und demnach auch weiterhin als unspezifische Veränderungen anzusehen sein werden. Bezüglich der im Plasma der pigmentierten und der pigmentlosen Nervenzellen bei der Encephalitis epidemica gefundenen Gebilde hat die neuerliche Untersuchung keinen Grund gegen die Auffassung derselben als degenerativer Veränderungen unspezifischer Art, nämlich lipoider Substanzen, ergeben. Für die N.K., die G.K. und die von mir beschriebenen Herpesveränderungen resultiert aus diesen Untersuchungen, daß sie auch aus lipoiden Substanzen bestehen; von diesen Substanzen kann angenommen werden, daß sie es sind, die den genannten Körperchen die besondere Färbbarkeit verleihen.

Fassen wir die Ergebnisse dieser vergleichenden Untersuchungen nunmehr zusammen, so kann das in folgenden Sätzen geschehen:

Die bei den gewöhnlichen Färbungen sich zeigenden Uebereinstimmungen der H.K. der Autoren mit den G.K. haben bei Untersuchung nach anderen Methoden sich nicht mehr als bestehend erwiesen, insofern an den ersteren sich zunächst eine geringe Azidophilie bemerkbar machte (Lentz u. Mallory), dann aber ein weitgehender Unterschied in der Färbung auftrat (Stutzer, Unna-Pappenheim). Derselbe Unterschied ergab sich auch beim Vergleich mit den N.K.

Diesen H.K. der Autoren, die ihrer Zusammensetzung nach als Oxychromatin aufgefaßt werden, konnte schon früher eine spezifische Bedeutung nicht zugesprochen werden, insbesondere aber können sie auch deshalb nicht als spezifische „Einschlüsse" aufgefaßt werden, weil sie von anderen Untersuchern, so z.B. von Spielmeyer, als Teilerscheinung der bei den verschiedensten Affektionen vorkommenden „homogenisierenden Erkrankung" der Ganglienzellen des Gehirnes beschrieben und abgebildet worden sind (Histopathologie des Nervensystems. S. 77, 78)[1].

Bezüglich der G.K. und N.K. ergab sich eine vollständige Uebereinstimmung in färberischer Beziehung, die sich auch auf die sog. Innenstruktur erstreckte. Eine vollständige färberische Uebereinstimmung mit den genannten zwei Körperchenarten ergab sich (mit Ausnahme der Innenstruktur) auch bezüglich gewisser, in den Kornealzellen bei der Herpesaffektion auftretender Gebilde, welche letztere ich oben beschrieben und abgebildet habe und über die ich in der Literatur nichts angegeben gefunden habe, weshalb ich diesen Befund als etwas Neues hinstellen möchte.

Diese Körperchen möchte ich nach ihrem ganzen Verhalten als Degenerationsprodukte auffassen, trotzdem sie z. B. gelegentlich von einem Hof umgeben sind oder den Kern einbuchten. Diese letzteren Vorkommnisse genügen zur Feststellung eines „Einschlusses" jedenfalls nicht.

Es erscheint interessant, daß alle diese drei in Rede stehenden Gebilde, wie sich aus dem färberischen Verhalten ergibt, augenscheinlich aus derselben Grundsubstanz bestehen. Diese Grundsubstanz ist oder enthält, wie sich wieder aus Vergleichen ergibt, ein Lipoid, und diese lipoide Substanz ist es augenscheinlich, die den Körperchen ihre besondere Färbbarkeit verleiht.

Daß bei der Herpes-Encephalitisaffektion der Kaninchenkornea einerseits und der Vakzineveränderung derselben andererseits in bezug auf Form, Lagerung (in- und außerhalb des Kernes) und Färbbarkeit so weitgehend übereinstimmende Veränderungen auftreten, ist ein Beweis mehr für die nahe Verwandtschaft dieser beiden grobanatomisch und klinisch sich so sehr ähnelnden Prozesse. Dieser Umstand scheint mir im Sinne der Annahme eines ätiologischen Zusammenhanges zwischen der Blatternschutzimpfung und der Encephalitis in unseren Fällen eventuell verwertbar zu sein.

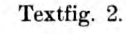
Es erhebt sich die Frage, ob mit der Feststellung der Lipoidnatur gewisser Einschlüsse etwas für das Verständnis des Wesens derselben gewonnen wurde. In dem Artikel von v. Prowazek u. Lipschütz über die allgemeinen Eigenschaften der Chlamydozoen heißt es: „An

1) Siehe auch Neubürger, Ueber zerebrale Luft- und Fettembolie. S. 306.

diesen Einschlüssen sind zum Teil Entwicklungsstadien der Erreger (Variola-Vakzine: Initialkörper, Scharlach desgleichen, Schleimhautepitheliosen: Initial-, Elementar- und Restkörper) selbst, zum Teil aber Reaktionsprodukte der Zelle (Plastin und Chromatin: Variola-Vakzine, Schleimhautepitheliosen: etwas Plastin, beim Epitheliom eine Lipoidfettkomponente) beteiligt."

Die allgemeine Meinung geht zurzeit dahin, daß die N.K. und die G.K. zum Großteil Reaktionsprodukte auf das eingedrungene Virus darstellen. Einzelne Autoren sprechen die in ihnen enthaltenen Innenkörper als die Erreger selbst an. Aus den obigen Ausführungen der Autoren geht hervor, daß man erstens sehr verschiedene Stoffe aufzählt, aus denen die Reaktionsprodukte aufgebaut sind; und daß zweitens lipoide Substanzen als Bestandteile nur an einer Stelle angeführt werden. Der von mir oben wahrscheinlich gemachte, gleichartige Aufbau der Hauptmasse verschiedener Einschlüsse aus ein- und derselben lipoiden Substanz könnte, glaube ich, im Sinne der Deutung der genannten Gebilde als rein degenerativer Veränderungen verwertet werden. Erstens ist uns nämlich das Sichtbarwerden von Lipoidsubstanzen als Ausdruck der Degeneration sehr geläufig,

Textfig. 1.









Textfig. 1. Umwandlung des Kernes in eine Morulaform. Nierenepithelzelle nach Unterbindung der Art. renal. Schmaus u. Albrecht.

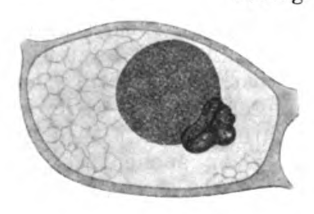
Textfig. 2. a) Konjunktivaepithelzelle mit Trachomeinschluß. Halberstädter, Handb. d. path. Prot. Taf. IV, Fig. 6 [verbesserte Numerierung]. b) Nierenepithelzelle. Schmaus u. Albrecht. Beiden Zellen, a und b, ist gemeinsam ein dem Kern aufsitzendes Gebilde mit größeren und kleineren färbbaren Körnchen.

zweitens würde, glaube ich, auch die Gleichartigkeit der Veränderung bei verschiedenen Affektionen in der Richtung der Degeneration verwertet werden können. Nun wird man sagen, das Ausschlaggebende bei der Beurteilung eines Gebildes als Einschluß oder nicht sind nicht die Reaktionsprodukte der Zelle, sondern die entweder in den Reaktionsprodukten eingeschlossenen oder frei in den Zellen liegenden Gebilde, die von den Autoren als Entwicklungsstadien der Erreger aufgefaßt werden. Diese Gebilde färben sich in der Mehrzahl der Fälle wie das Basichromatin des Kernes, dürften also aus demselben Stoffe bestehen. Es ist nun die Frage, ob diese Gebilde, von denen die spezifische Natur der Einschlüsse hauptsächlich hergeleitet wird, wirklich von außen her in die Zelle eingedrungene Erreger, bzw. deren Abkömmlinge sein müssen, oder ob sie nicht auch aus dem Kern stammen können. Daß die verschiedenen Kernbestandteile, insbesondere das Chromatin, in das

Plasma austreten können, ist bei einer Reihe von Prozessen beschrieben worden. Wenn es nun gelänge, bei den nach irgendwelchen unspezifischen Eingriffen auftretenden Zellenveränderungen diesen spezifischen Einschlüssen ähnliche oder gar ihnen analoge Bilder zu finden, dann könnten derartige Veränderungen nicht mehr im Sinne von eingeschlossenen Erregern gedeutet werden.

Ich will nun nicht behaupten, solche gefunden zu haben, aber es gibt doch überraschende Aehnlichkeiten. So seien aus der Arbeit von Schmaus u. Albrecht über Karyorrhexis einige Bilder von Nierenzellenveränderungen nach Unterbindung der Arteria renalis wiedergegeben. Die erste Veränderung (Textfig. 1) ähnelt einer Morula, wie wir sie von der Hundestaupe her kennen; in Textfig. 2 ist in a eine Epithelzelle mit Trachomeinschluß, in Textfig. 3a eine mit einem Einschluß von Epithelioma contagiosum wiedergegeben, daneben ist immer eine geschädigte Nierenepithelzelle (Textfig. 2b u. Textfig. 3b) aus der Arbeit von Schmaus u. Albrecht gestellt. Textfig. 2 zeigt in beiden Abbildungen ein dem Kern anhaftendes Gebilde mit verschieden großen Bröckeln färbbarer Substanz, in der Textfig. 3 findet sich je ein blasiges Gebilde mit kleinsten färbbaren Körnchen im Plasma; in beiden Zellen dieser Figur werden die im Plasma augen-

Textfig. 3.





a b

Textfig. 3. a Epithelzelle mit Einschluß von Epithelioma contag. Neumann-Mayer, S. 344, Fig. 135. b Nierenepithelzelle wie bei Textfig. 1, Schmaus u. Albrecht. Kern und Einschluß bzw. Kernderivat überschneiden sich in analoger Weise.

scheinlich frei liegenden Gebilde von der Kernkontur überschnitten. Die Aehnlichkeit ist eine augenfällige, und sie würde wahrscheinlich eine noch größere sein, wenn alle diese Bilder nach derselben Methode gefärbt und von demselben Zeichner nach derselben Manier hergestellt worden wären. Und doch handelt es sich in den von Schmaus und Albrecht abgebildeten Veränderungen zweifellos um unspezifische Kernderivate und in den 2 anderen Fällen werden die Gebilde, die sich im allgemeinen ebenso wie das Basichromatin des Kernes färben, als eingedrungene Erreger aufgefaßt.

Abgesehen aber von diesen durch Austritt von Kernsubstanzen entstandenen Veränderungen können den „Einschlüssen" ähnliche Gebilde im Protoplasma selbst entstehen; diesbezüglich möchte ich wieder auf die in meinem Artikel über Ganglienzelleinschlüsse auf Tafel IX gebrachte Figur 9 verweisen und ferner auf die anscheinend ganz analogen Veränderungen, die Anitschkoff an Leberzellen nach der Einwirkung hypotonischer Kochsalzlösung entstehen sah, und die er auf veränderte Zellgranula (Mitochondrien) zurückführt. Derartige Gebilde werden wahrscheinlich auch bei verschiedenen Methoden die verschiedensten Färbeeffekte zeigen.

Gewiß sollen aus derartigen Aehnlichkeiten nicht zu weitgehende Schlüsse gezogen werden. Rein morphologische Untersuchungen werden wahrscheinlich zur Klärung dieser Fragen überhaupt nicht genügen. Doch möchte ich in Hinblick auf alle diese Befunde meine Meinung in bezug auf die von mir untersuchten Gebilde, die N.K., die G.K. und die von mir bei der Herpesaffektion beschriebenen Gebilde dahin äußern, daß ich sie alle, insbesondere wegen des vollkommen analogen Aufbaues ihrer Grundsubstanz aus Lipoiden, für Degenerationsprodukte halte. Ich stehe diesbezüglich nicht allein; insbesondere von Seite der Histopathologen ist diese Ansicht schon oft vertreten worden[1]). Der Zeitpunkt, eine Revision unserer Ansicht auf diesem Gebiete anzuregen, scheint gerade jetzt nicht ungünstig gewählt. Es sind eben jetzt auch sonst Aenderungen unserer Anschauungen über die filtrierbaren Erreger eingetreten, so durch die Darstellung der Erreger der Peripneumonie, die Feststellung des Virus des Gelbfiebers und die Züchtung desjenigen der Maul- und Klauenseuche. Jeder Tag kann uns bei den fortwährenden Verbesserungen der Züchtungsverfahren und der Optik neue Ueberraschungen bringen.

Untersuchungen auf Guarneri-Körperchen.

Um nun wieder zum eigentlichen Thema zurückzukommen, soll jetzt über die schon früher begonnenen und nun fortgesetzten Untersuchungen der Gehirne der Kaninchen berichtet werden, welche an der Vakzineencephalitis zugrunde gegangen waren. Die Untersuchungen haben sich jetzt vor allem in der Richtung bewegt, in den Gehirnen nach Zellveränderungen im Sinne der G.K. zu suchen.

Die Untersuchungen wurden mit den verschiedenen für „Einschlüsse" gebräuchlichen Methoden vorgenommen. Die entzündlichen Veränderungen sind schon oben geschildert worden. An den Ganglienzellen wurden zwar verschiedene Abweichungen von der Norm gefunden, doch konnte nur ein Teil dieser im Sinne einer krankhaften Veränderung gedeutet werden, bei anderen konnte „künstliche Schwellung" usw., wie sie Spielmeyer insbesondere in tierischen Gehirnen als häufig angibt, nicht ausgeschlossen werden[2]) Als einzig sicher zu verwerten schienen mir Zellschrumpfungen in der Rinde, weil bei ihnen das Sichtbarwerden des korkzieherartig gewundenen Spitzenfortsatzes eine vollständige Uebereinstimmung mit den Spielmeyerschen Abbildungen von dieser Affektion ergab. Andere Veränderungen, insbesondere solche, die den Guarneri-Körperchen entsprochen hätten, konnten trotz eifrigen und vielfach wiederholten Suchens nicht gefunden werden. Auch die Veränderungen, die von den Autoren bei der Herpesaffektion in den Kaninchengehirnen als Herpeskörper nachgewiesen sind, kamen nicht zur Beobachtung[3]). Der Vollständigkeit halber sei noch erwähnt, daß eine nennenswerte Beteiligung der Glia an dem nach Vakzineinfektion im Kaninchenhirn auftretenden Entzündungsprozeß auch in akuten Fällen nicht zu beobachten war.

1) Bezüglich der Negrischen Körperchen sind vor kurzem Benedek u. Porsche zu der gleichen Anschauung gekommen. (Abh. aus d. Neur. Psychol. etc. 1924. H. 14.)

2) So fanden sich insbesondere Aufhellungen und Blähungen der Zellen im Ammonshorn, und zwar gerade in der Zone, die Husler und Spatz bei der Keuchhusteneklampsie der Kinder als besonders lädiert bezeichnen; da aber in meinen Fällen die Kernveränderungen der homogenesierenden Erkrankungen fehlten, kann ich diese Befunde nicht mit Sicherheit verwerten. Aehnliche Veränderungen fanden sich an den Purkinje-Zellen.

3) Ich habe solche allerdings bei mehreren an der Herpesencephalitis zugrunde gegangenen Kaninchen auch nicht finden können.

Es war also die zweite Bedingung, an die die Annahme eines ätiologischen Zusammenhanges zwischen der Blatternschutzimpfung und der Encephalitis geknüpft werden konnte, nämlich der Nachweis von für die Vakzineencephalitis der Kaninchen charakteristischen Veränderungen, nicht erfüllt worden.

Es erübrigt noch die Beschreibung der zellulären Veränderungen in den Gehirnen der 3 nach der Blatternschutzimpfung zugrunde gegangenen Kinder. Auch diese sollten ja in der Richtung auf das Vorhandensein spezifischer Veränderungen untersucht werden. In dieser Hinsicht wurde insbesondere den Ganglienzellen der Substantia nigra, welche bei der Encephalitis epidemica so sehr angegriffen erscheint, unsere erhöhte Aufmerksamkeit zugewendet, dann aber auch denen des Pons, und ferner den Zellen des Ammonshornes. Auch hier wurden die verschiedensten Färbungen verwendet.

Die Substantia nigra hatte schon bei der Betrachtung mit freiem Auge in allen 3 Fällen eine sehr geringe Ausbildung gezeigt, sie war kaum zu erkennen gewesen.

Im Falle G. H. zeigten die Ganglienzellen der S. n. an beiden Enden dieses Streifens ein ungefähr normales Verhalten in bezug auf ihre Zahl. Im mittleren Teil der genannten Zone zeigte sich vor allem eine hochgradige Gliawucherung, verbunden mit Auftreten pathologischer Gliazellformen, nämlich sog. gemästeter und vakuolisierter. An diesen gliareichen Stellen erschienen die Ganglienzellen an Zahl vermindert. In der ganzen S. n. aber konnte festgestellt werden, daß die färbbare Substanz der Ganglienzellen an den Rand des Plasmas getreten war und die Mitte aufgehellt erschien, etwa so wie bei der schweren Zellerkrankung Nißls; die Kerne erschienen dabei hell. Ob diese Erscheinungen nicht zum Teil kadaveröse waren, muß dahingestellt bleiben, siehe diesbezüglich auch die Beschreibung des Ammonshornes! Das Pigment in den Ganglienzellen war (augenscheinlich dem kindlichen Alter entsprechend) spärlich; eine Ausstreuung desselben im Gewebe oder eine Aufnahme desselben durch Gliazellen war nicht zu bemerken. Im Ammonshorn war die Struktur der Ganglienzellen — jedenfalls wegen der zu spät erfolgten Herausnahme und Fixierung der Gehirne — eine derartig schlechte, daß von einer Besprechung derselben abgesehen werden muß. Es konnte aber festgestellt werden, daß im Gyrus hippocampi sehr deutliche perivaskuläre Gliawucherung bestand.

Das zweite Gehirn, das des Mädchens G. M., zeigte im allgemeinen dieselben Veränderungen wie das erste, nur in noch höher ausgebildetem Maße; hier war nämlich die ganze S.n. von Gliawucherung durchsetzt, und zwischen diesen Gliazellen fanden sich auch noch Leukozyten in reichlicher Menge. Diese Veränderungen fanden sich auch in der weiteren Umgebung der S. n., die Verminderung der Zahl der Ganglienzellen erstreckte sich hier auf die ganze S. n., die Veränderungen an ihnen waren dieselben wie im ersten Falle. Eine ganz besonders starke Gliawucherung fand sich im Gyrus hippocampi.

Was schließlich den dritten Fall (St.) anbelangt, erwies sich in diesem die S. n. nicht überall angegriffen, doch erstreckten sich die in der Nachbarschaft reichlich vorhandenen Infiltrate stellenweise auch in sie hinein; an solchen Stellen war dann ein deutlicher Ausfall von Ganglienzellen festzustellen. Die innerhalb der Gefäßwand und um dieselbe gelegenen Infiltrate zeigten das gewöhnliche Bild; in der weiteren Umgebung der Gefäße fanden sich aber so mächtige Gliawucherungen, daß sie an den Präparaten schon mit freiem Auge als dunkle Streifen sichtbar waren. Dies war besonders am Pes pedunculi der Fall. Die Gliazellen befanden sich an diesen Stellen im Zustande der progressiven Veränderung. Im Gyrus hippocampi dieses Falles war die perivaskuläre Gliawucherung zwar auch wieder zu sehen, jedoch schwächer als in den zwei früheren Fällen ausgeprägt.

Weder mittels der gewöhnlichen noch mittels der speziellen Färbemethoden konnten in den drei Gehirnen einschlußähnliche Gebilde nachgewiesen werden, was allerdings bei der starken kadaverösen Veränderung der Gehirne auch nicht sehr beweisend ist.

Auch bezüglich dieser Kindergehirne muß zusammenfassend gesagt werden, daß der Nachweis irgendeiner

für Vakzineaffektion spezifischen oder charakteristischen Zellveränderung, etwa von G.K., nicht erbracht werden konnte. Auffallend war die in diesen Fällen so stark hervortretende Gliawucherung.

Zusammenfassung.

Ueberblicken wir nunmehr alle diese erhobenen und gefundenen Tatsachen und betrachten sie auf ihre Verwertbarkeit in bezug auf den ätiologischen Zusammenhang der Blatternschutzimpfung und der danach aufgetretenen Encephalitis, dann müssen wir sagen, daß es einige gibt, die für diesen Zusammenhang sprechen können, andere aber wieder dagegen.

Von denen, die dafür sprechen, wären zu nennen:

1) daß die Gehirnentzündungserscheinungen bei den Kindern im Anschluß an die Impfung und bei allen nach demselben, nämlich 10-tägigen, Intervall aufgetreten sind;

2) daß zu derselben Zeit und auch schon längere Zeit vorher am selben Ort keine Fälle von Encephalitis epidemica festgestellt worden waren, trotzdem im Nachbarbezirk kurz vorher eine ausgesprochene Epidemie geherrscht hatte;

3) daß bei den Krankheitsfällen die sonst meist vorhandenen katarrhalischen Erscheinungen gefehlt hatten;

4) daß man imstande war, im Kaninchenversuch mit der betreffenden Lymphe (bzw. mit unserer staatlichen Lymphe überhaupt) von einem entfernteren Orte (von der Kornea) aus eine tödliche Encephalitis zu erzeugen;

5) daß diese tödliche Kaninchenencephalitis klinisch ähnlich verlief wie die durch das Herpesvirus hervorgerufene, von welchem Virus angenommen werden kann (bzw. von einer Reihe von Untersuchern auch angenommen wird), daß es mit dem der Encephalitis epidemica identisch sei;

6) daß sich die Vakzineencephalitis beim Kaninchen anatomisch ganz analog verhält, wie die durch das Herpesencephalitisvirus hervorgerufene;

7) daß schließlich gezeigt werden konnte, daß mit den beiden Virusarten an den Zellen der Kaninchenkornea Veränderungen hervorgerufen werden können, die weitgehende Uebereinstimmung zeigen.

Insbesondere die letzten drei Punkte sprechen dafür, daß zwischen den beiden Affektionen bzw. Virusarten, der der Vakzine und der der Herpes-Encephalitiserkrankung, so weitgehende Uebereinstimmungen bestehen, daß man annehmen könnte, daß auch einmal durch das Vakzinevirus, d. h. durch die Blatternschutzimpfung, ebenso wie durch das Virus der Herpes-Encephalitiskrankheit beim Menschen eine Gehirnentzündung hervorgerufen werden könne.

Als Gegengründe gegen die Annahme eines ätiologischen Zusammenhanges zwischen der Impfung und der Hirnentzündung in den genannten Fällen können angeführt werden:

1) daß in den vielen Tausenden von Fällen, die mit der Lymphe gleicher Provenienz geimpft worden waren, nichts Aehnliches beobachtet worden war, bzw. daß überhaupt über Impfschäden in der letzten Zeit nichts berichtet worden ist;

2) daß der direkte Nachweis des Zusammenhanges, der nur durch die Tierimpfung vom Sektionsmaterial aus hätte erbracht werden können, nicht erbracht worden ist;

Daß es nicht gelungen ist, in den Gehirnen der zugrunde gegangenen Kinder charakteristische, für Vakzineinfektion sprechende Veränderungen im Sinne der G.K. zu finden, würde nicht so sehr ins Gewicht fallen, da solche auch bei den mit Vakzine geimpften Kaninchen nicht nachweisbar waren und auch bei der Herpesencephalitis der Kaninchen nicht immer H.K. gefunden werden.

Aus diesen Für- und Gegengründen hätte man sich kaum eine feste Meinung bilden können, und die Sachlage wäre wohl ganz ungeklärt geblieben. Während der Niederschrift dieser Zeilen aber stieß ich auf eine Notiz, die mir von höchster Wichtigkeit für die Beurteilung meiner Fälle zu sein scheint, weil sie diesen meinen Beobachtungen, die viel zu gering an Zahl waren, um beweisend wirkend zu können, einen ganz anderen Hintergrund zu geben imstande ist. In Nr. 11 der Schweizer med. Wochenschr. Jg. 1925 erschien von O. Stiner ein kurzer Artikel „Zur Frage der Impfschädigungen". In der Einleitung heißt es: „Es wurden seit einiger Zeit in einer gewissen Presse eine Anzahl von Erkrankungen schwerster Art als direkte Folgen der Schutzimpfung gegen Pocken gemeldet. Bei näherem Zusehen ließ sich allerdings für einen großen Teil dieser Fälle ein ursächlicher Zusammenhang mit der Impfung ausschließen, bei anderen konnte aber die Möglichkeit einer Impfschädigung nicht ohne weiteres von der Hand gewiesen werden."

Es heißt dann weiter:

„In neuester Zeit hatten namentlich zwei schwere Erkrankungen in Puntrut, bei denen die Diagnose Meningitis serosa gestellt worden war, Aufsehen erregt; beide waren 10 Tage nach erfolgter Impfung[1]) aufgetreten. Diese beiden Fälle bildeten den Ausgangspunkt der Besprechung (sc. einer Anzahl von Universitätslehrern, die sich besonders mit Pocken- und Impffragen beschäftigt hatten und von dem eidgenössischen Gesundheitsamte zu einer Aussprache über die Frage der Impfschädigungen einberufen worden waren). Es war darüber (über die beiden Fälle) auf Verlangen der Berner kantonalen Sanitätsdirektion eine Untersuchung veranstaltet worden, und der mit der Begutachtung betraute Universitätslehrer war zu dem Schluß gekommen, daß ein Zusammenhang mit der Impfung wahrscheinlich sei. Die Meinung der Konferenz über diesen Punkt war geteilt; während einzelne Votanten eine Wahrscheinlichkeit eines Zusammenhanges anzunehmen gewillt waren, wollten die anderen nur die Möglichkeit einräumen.

1) Von mir gesperrt.

Es wurde festgestellt, daß nach dem Ergebnis der Untersuchung die Impfungen in Puntrut absolut kunstgerecht durchgeführt und der verwendete Impfstoff, von dem das Serum- und Impfinstitut ca. 22 000 Dosen an Aerzte abgegeben hatte, sonst keinerlei Schädigungen verursacht habe. Der Impfstoff, der gut gelagert und in der üblichen Weise nach allen Richtungen vorgeprüft war, zeigte auch bei Laboratoriumsversuchen, die nach Bekanntwerden der beiden Erkrankungen in Puntrut angestellt wurden, keinerlei Eigenschaften, aus denen man auf eine besondere Wirkung auf das zentrale Nervensystem hätte schließen können. Es wurden noch weitere Erkrankungen nach Impfung aus früheren Jahren erwähnt, bei denen ein Zusammenhang mit dieser zum Teil nicht sicher auszuschließen war. In einem Falle war eine langdauernde Erkrankung der Sehnerven, bei einem anderen eine wahrscheinlich bleibende Schädigung des Intellekts erfolgt, im dritten Falle waren im Anschluß an die Impfung meningitische Erscheinungen aufgetreten usw. Ueber derartige Erscheinungen ist in der Literatur der letzten Jahrzehnte fast nichts zu finden, so daß man bei diesen Fällen auf ein Zusammentreffen besonderer Umstände, vielleicht auch auf eine erhöhte Krankheitsbereitschaft des zentralen Nervensystems, wie sie sich bei uns in den letzten Jahren etwa in dem vermehrten Auftreten von Poliomyelitis, Encephalitis und teilweise auch Meningitis zeigt, schließen müßte.

Die Konferenz war der Meinung, daß bei den Hunderttausenden von Impfungen, wie sie im Verlaufe der jetzt 4 Jahre dauernden, weit verbreiteten (Blattern-) Epidemie in unserem Lande ausgeführt wurden, eine gewisse Anzahl von Schädigungen auch bei der größten Sorgfalt seitens der Aerzte und der Impflinge nicht zu vermeiden war. Die Impfung ist nach wie vor die einzige sicher wirkende Waffe im Kampfe gegen die Pocken, die bei einer nächsten Epidemie höchstwahrscheinlich wieder mit der alten Bösartigkeit auftreten werden. Es sollte deswegen alles getan werden, um dieses wichtige Vorbeugungsmittel nicht in Mißkredit geraten zu lassen. Es wurde die Abfassung einer neuen Impfvorschrift beschlossen, in der auf die offenbar bestehende Ueberempfänglichkeit unserer Bevölkerung noch mehr als bisher Rücksicht genommen und dementsprechend eine möglichst milde Art der Impfung empfohlen wird. In einer weiteren Veröffentlichung soll auf die Aufklärung der Bevölkerung über Pocken und Impfung hingearbeitet werden. Ferner wurde betont, daß auf die Belehrung der Studierenden in der Impffrage die größte Sorgfalt verwendet und, wenn möglich, von ihnen besondere Ausweise über die Anhörung von Vorlesungen über Pocken und Vakzination und die praktische Durchführung von Impfungen verlangt werden soll.

Ein Protokoll der Konferenz wird im Bulletin des eidgenössischen Gesundheitsamtes veröffentlicht werden."

Aus diesem Bericht aus der Schweiz geht also hervor, daß dortselbst Impfschäden vorgekommen sind, daß diese Schädigungen in den angeführten Fällen stets das Zentralnervensystem betroffen haben, daß in 2 speziellen Fällen eine Meningitis serosa aufgetreten war, und daß in diesen 2 Fällen die Zeit zwischen Impfung und Auftreten der Meningitis 10 Tage betragen hat. Diese Affektionen wurden von einem Teil der Begutachter als direkte Folgen der Impfung aufgefaßt, und es wurde auf die besondere Krankheitsbereitschaft des Zentralnervensystems bei der Schweizer Bevölkerung als unterstützendes Moment hingewiesen, eine Krankheitsbereitschaft, die sich in dem reichlichen Auftreten von Poliomyelitis, Encephalitis und auch Meningitis geäußert hat.

Durch diese Feststellung in einem anderen Lande, das in letzter Zeit, wie eben gesagt, ein besonders häufiges Auftreten von Erkrankungen des Zentralnervensystems gezeigt hatte und in dieser Beziehung mit dem unserigen sehr übereinstimmt, bekommen meine Fälle eine viel größere Bedeutung, insbesondere durch die 2 Beobachtungen von Meningitis serosa und dadurch, daß bei diesen die Inkubationszeit auch 10 Tage betrug, wie in den meinigen. Jetzt kann hier auch noch ein Fall von Encephalitis angeführt werden, der nach Blatternschutzimpfung von Jehle in Wien beobachtet worden ist. Alle diese Fälle weisen darauf hin, daß tatsächlich eine besondere Krankheitsbereitschaft des Gehirnes in unserer Zeit zu bestehen scheint, und diese Krankheitsbereitschaft, die einmal zu einer Entzündung der Hirnhäute führt, kann, glaube ich, ebensogut auch einmal zu einer Entzündung des Gehirnes selbst führen. Wir dürften aber dann diese Gehirnentzündung nach der Vakzination nicht unter die Fälle von Encephalitis epidemica rechnen, wenn wir diese letztere als eine eigene Krankheit auffassen.

Gewiß ist durch diese Mitteilung aus der Schweiz für meine Beobachtungen nicht der strikte Beweis erbracht worden, daß es sich dabei wirklich um einen kausalen Zusammenhang zwischen Vakzination und Gehirnentzündung gehandelt hat, aber die Wahrscheinlichkeit, daß ein solcher vorlag, ist um ein ganz Bedeutendes gestiegen.

Da, wie gesagt, der strikte Beweis für den kausalen Zusammenhang zwischen der Blatternschutzimpfung und der Encephalitis in meinen 3 Fällen aussteht, kann man bezüglich dieses Zusammenhanges drei Möglichkeiten annehmen, die in folgender Weise formuliert werden können:

1) Die durch die bekannten Gehirnveränderungen ausgezeichnete und jetzt als Encephalitis epidemica bezeichnete Erkrankung wird durch einen einheitlichen, bestimmten Erreger hervorgerufen. Dann kann die Blatternschutzimpfung in unseren Fällen den Erregern den Eintritt erleichtert haben, oder sie hat die schon bestehende Infektion manifest gemacht.

2) Die als Encephalitis epidemica bezeichnete Krankheit ist gar keine eigentliche Krankheitseinheit, sondern nur ein Symptomenkomplex, der durch die verschiedensten Erreger hervorgerufen werden kann. Diese Ansicht wurde in der letzten Zeit von Doerr und Zdansky ausgesprochen, und es wurde dabei angeführt, daß der Erreger der Herpesaffektion nur gelegentlich die E. e. hervorrufen könne, daß auch ein anderes Virus, z. B. das von Kling oder das lyssaähnliche von Koritschoner, dies eventuell imstande sei. Dann wäre es nicht gar so unmöglich, daß auch einmal beim Menschen das Vakzine-Variolavirus der Erreger einer Encephalitis sein könnte, so wie er es beim Kaninchen stets ist.

3) Wäre es möglich, daß die Encephalitis epidemica nicht durch eine Infektion im gewöhnlichen Sinne des Wortes hervorgerufen wird, sondern daß die klinischen Erscheinungen und anatomischen Läsionen, die dabei zutage treten, nur die Folge einer Vergiftung mit Substanzen sind, welche giftigen Substanzen durch verschiedene Prozesse im Körper produziert werden können — im Sinne der Theorie von A. Fuchs. — In diesem Sinne würden die Experimente von Jahnel und Illert, insbesondere aber der Nachweis der Uebertragbarkeit derartiger, durch Gifte erzeugter Encephalitiden durch Silberstein sprechen. Wenn diese Möglichkeit der Entstehung des Symptomenkomplexes der Encephalitis epidemica besteht, dann wären z. B. bei einer Impfung von Kindern mit Magendarmstörung[1]) alle Bedingungen für das Auftreten solcher Symptome gegeben; die Gifte würden vom Magendarmkanal geliefert, und das Zentralnervensystems würde durch das Vakzinevirus für ihre Aufnahme vorbereitet.

Für die unter Punkt 2 und 3 angeführten Möglichkeiten käme die für unsere Zeit so charakteristische Krankheitsbereitschaft des Gehirns als sehr wichtiges unterstützendes Moment hinzu. Auf diese Krankheitsbereitschaft des Gehirnes muß sogar ein besonderer Nachdruck gelegt werden, denn sie kann überhaupt möglicherweise die Ursache der Encephalitisepidemien sein, welche ja nicht alle Jahre auftreten, sondern nur in großen Zeitintervallen. Diese Epidemien sind sicher etwas derartig Auffallendes, daß ihr Auftreten nicht übersehen, sondern notiert worden wäre, wenn man sie zu Gesicht bekommen hätte. Und doch hören wir nur ganz ausnahmsweise von ihnen. Es dürfte in den betreffenden Zeitabschnitten doch wohl ein unterstützendes Moment da sein, welches das Auftreten solcher Epidemien erst möglich macht. Daß in unserem Falle das unterstützende Moment durch den Krieg mit seinen so tief einschneidenden Veränderungen in der Lebensweise und insbesondere der Ernährung geliefert wird, liegt auf der Hand.

Welche von den 3 eben angeführten Möglichkeiten in unseren Fällen zugetroffen haben mag und welche Annahme die richtige ist, läßt sich aus den vorliegenden Tatsachen nicht mit Sicherheit entscheiden. Immerhin wollte ich meine Untersuchungsresultate mitteilen, weil vielleicht einmal darauf weitergebaut werden kann, und weil doch gewisse Nutzanwendungen für die Impfpraxis aus ihnen abgeleitet werden können.

Ich bin am Ende meiner Ausführungen. Schon in der Diskussion, die sich an meine seinerzeitige vorläufige Mitteilung angeschlossen hatte, habe ich mit besonderem Nachdruck darauf hingewiesen, daß ich mit diesen Ausführungen durchaus nicht etwa die Blatternschutzimpfung in Mißkredit bringen möchte. Die Blatternschutzimpfung ist das einzige Mittel, mit dem wir die Blatternerkrankung in wirksamer

---

1) die bei einem der drei oben beschriebenen Fälle tatsächlich vorhanden war.

Weise zu bekämpfen imstande sind, und der unzweifelhafte Wert dieser Maßregel ist durch jahrhundertelange Erfahrung festgestellt. Auch bei uns wird der ganzen Frage die größte Aufmerksamkeit zugewendet, und unsere Studenten sind gezwungen, wenn sie absolvieren wollen, sich auch praktisch mit der Methode dieser Schutzimpfung zu beschäftigen. Es scheint mir daher nicht schädlich, sondern eher wünschenswert, daß auch einmal auf gelegentliche Schädigungen, die aus dieser Impfung hervorgehen können, hingewiesen wird, damit eben diese Schädigungen, welche die Blatternschutzimpfung in Mißkredit bringen könnten, vermieden werden. Aus denselben Erwägungen heraus läßt gerade jetzt unser Pädiater, Prof. Langer, in den Prager ärztlichen Nachrichten einen Artikel erscheinen, der sich mit den Impfschäden und ihrer Vermeidung beschäftigt. Ich glaube, daß eben auch aus den von mir oben geschilderten Vorfällen diesbezügliche Lehren gezogen werden können. In erster Linie wäre es die, daß Kinder, die sich nicht ganz wohl befinden, von der Impfung ausgenommen werden sollten, bzw. daß die Impfung bei ihnen erst nach Eintritt des vollen Wohlseins nachzuholen wäre. Dies ist ein Grundsatz, der schon seit langem in der Kinderheilkunde gelehrt bzw. anempfohlen wird, und dem auch in unserem Impfgesetze vom Jahre 1919 in vollkommener Weise Rechnung getragen wird. In dieser heißt es im § 11, b): Von der Impfpflicht befreit sind Personen, bei denen der Impfarzt sicherstellt, daß durch die Blatternschutzimpfung der Gesundheitszustand gefährdet werden könnte, oder die c) ein diesbezügliches Zeugnis eines öffentlich angestellten Arztes vorlegen.

Die zweite Lehre, die wir aus den hier niedergelegten Erfahrungen ziehen können, ist die, zur Zeit von Epidemien solcher Krankheiten, welche, wie die Encephalitis epidemica, die Poliomyelitis anterior und die Meningitis, das Zentralnervensystem befallen, mit den Impfungen ganz besonders vorsichtig vorzugehen. Wir wissen jetzt aus den oben angeführten experimentellen Untersuchungen, daß das Zentralnervensystem durch das, gleichgültig von welchem Orte, eingeführte Vakzinevirus in Mitleidenschaft gezogen wird; diese so erzeugte Schädigung dies Organes ist geeignet, für die oben genannten Erkrankungen den Boden vorzubereiten, ja es besteht sogar die Möglichkeit, daß sie dank der in solchen Zeiten augenscheinlich bestehenden „Krankheitsbereitschaft“ des Zentralnervensystems an sich genügt, um Krankheitserscheinungen von Seite desselben auszulösen. Es wird demnach Sache der betreffenden Behörden sein, in solchen Zeiten ganz besondere, ad hoc ausgearbeitete und nur für einen gewissen Zeitraum bestimmte Vorschriften herauszugeben, nach denen man sich bei der Vornahme der Impfungen zu richten hätte.

Die Untersuchungen, über die im Vorhergehenden berichtet wird, sind mir durch die Unterstützung der Deutschen Gesellschaft der Wissenschaften und Künste in der Tschechoslowakei ermöglicht worden.

Nachtrag bei der Korrektur.

Nach Fertigstellung des Manuskriptes kam ich zur Kenntnis des im nachfolgenden in möglichst wortgetreuer Uebersetzung wiedergegebenen Referates in dem Journal of the American Medical Association, Jahrg. 1925, Nr. 21:

Bastiaanse: Acute Encephalitis from Vaccination? Nederlandsch Tijdschrift v. Geneeskunde. Amsterdam 1925, March 14.

7 Tage, nachdem der Knabe mit Erfolg gegen Pocken geimpft worden war, bekam er Kopfschmerzen, taumelnden Gang und leichtes Fieber, und er wurde bewußtlos, aber ohne Lähmungen. Die Pupillen waren enge, es bestand Kernig u. Babinski. Das Bewußtsein kehrte erst nach Ablauf einer Woche zurück, und es bestanden Schmerzen in einem Bein durch mehrere Wochen. Fünf ähnliche Fälle von encephalitischen Symptomen wurden an anderen Orten der Niederlande im selben Monate beobachtet. Die Vakzine war in allen Fällen von derselben Firma. Bastiaanse bemerkt, daß das Vorherrschen der Encephalitis epidemica in den letzten Jahren dazu führen sollte, daß die neurotropen Eigenschaften der Vakzine geprüft werden, bevor dieselbe auf den Markt gebracht wird. Terburgh stellt aber diesbezüglich fest, daß die Bemühungen der Autoritäten, die neurotropen Eigenschaften der Vakzine ersichtlich zu machen, bis jetzt fruchtlos waren.

Inzwischen gelang es mir, in Kärnten 4 weitere Fälle von Vakzine-Encephalitis festzustellen. Sie wurden mir in freundlichster Weise von den Herren Prosektor Dr. Schindelka und Primarius Dr. Folger zur Verfügung gestellt. Die Inkubation betrug bei allen diesen Fällen, die sämtlich Kinder betrafen, ca. 8 Tage. Die klinischen Symptome bestanden insbesondere in Trismus bzw. in Zuckungen, ebenso wie in den 2 ersten von mir beobachteten Fällen. 2 von den Kindern genasen, 2 starben. Die histologische Untersuchung des Gehirnes des einen Falles, der obduziert worden war, ergab im Pons die für Encephalitis typischen perivaskulären Zellinfiltrate und Gliawucherungen[1]).

Einer mir vor kurzem zugegangenen brieflichen Mitteilung Bastiaanses entnehme ich schließlich, daß derselbe in Holland nunmehr im ganzen 35 Fälle von Encephalitis nach Vakzination gesammelt hat. Seine ausführliche Mitteilung darüber wird in den Bulletins der Akademie in Paris erfolgen.

Erklärung der Tafelabbildungen.

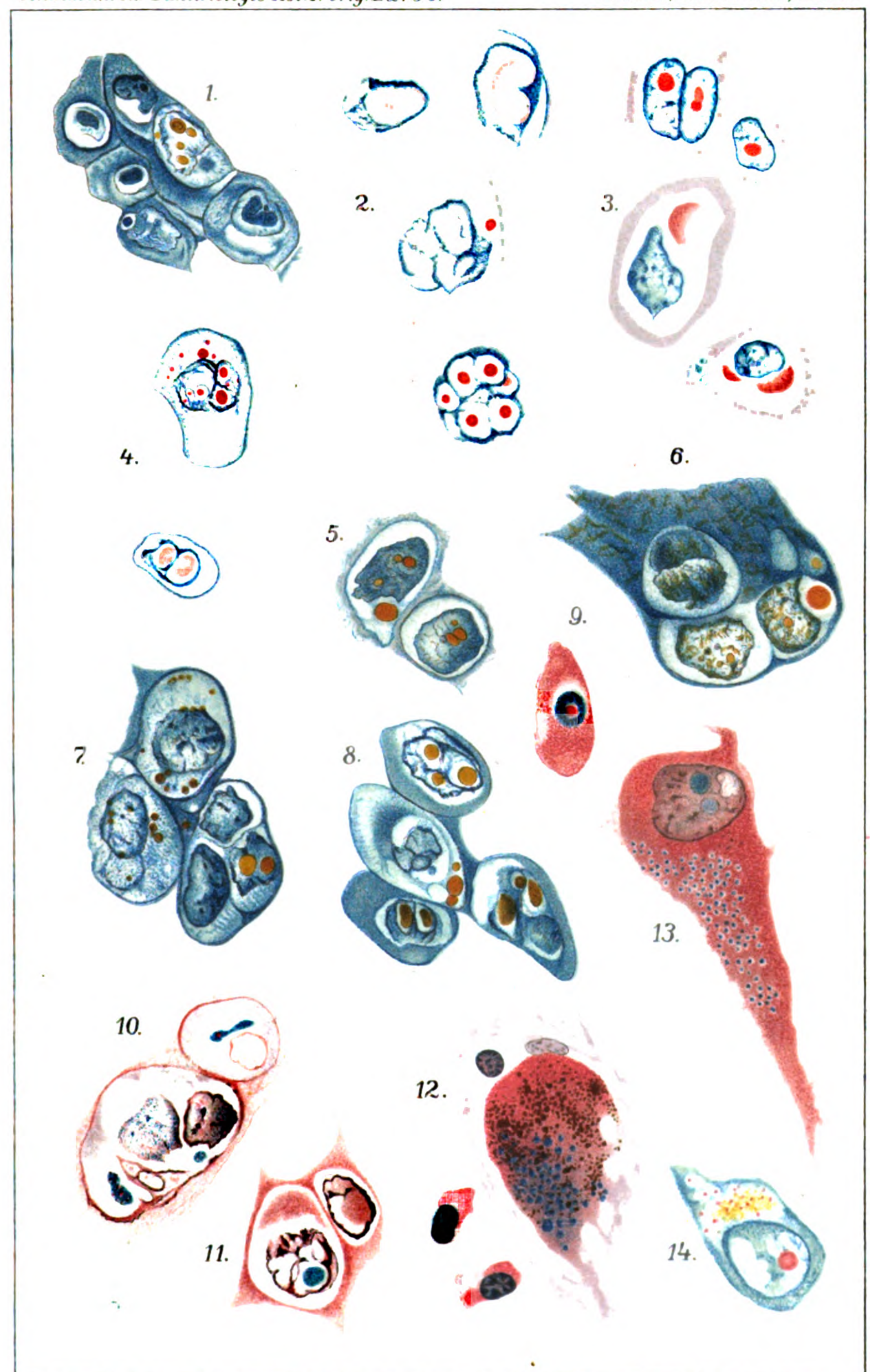
Fig. 1. Kaninchen. Cornea. Herpes. Mallory-Färbung. Herpeskörperchen blau, in einer Zelle gelbe Tropfen.

Fig. 2. Kaninchen. Cornea. Herpes. Lentz-Färbung. Oben Herpeskörperchen rosa, unten eine Zelle mit roten Tropfen im Kern, in der Mitte eine mit einem solchen im Plasma.

Fig. 3. Kaninchen. Cornea. Vakzine. Lentz-Färbung. Oben Guarnieri-Körperchen im Kern, unten im Plasma.

Fig. 4. Kaninchen. Cornea. Herpes. Lentz-Färbung. Unten im Kern rosa Herpeskörperchen, oben in Kern und Plasma leuchtend rote Tropfen.

1) Siehe diesbezüglich meine Mitteilung in der Medizinischen Klinik. Jahrg. 1925. H. 37.



Verlag von Gustav Fischer in Jena

Lith. Anst. v. E. Giltsch, Jena

Fig. 5. Kaninchen. Cornea. Herpes. Mallory-Färbung. Kernkörperchen gelb, im Plasma ein den Guarnieri-Körperchen entsprechendes Gebilde.

Fig. 6. So wie in Fig. 5.

Fig. 7. Kaninchen. Cornea. Herpes. Mallory-Färbung. Kleine gelbe Tropfen im Plasma. 2 größere im Kern (Nucleoli?).

Fig. 8. Kaninchen. Cornea. Herpes. Mallory-Färbung. Gelblich gefärbte Herpeskörperchen und leuchtend gelb gefärbte Gebilde in Kern und Plasma. Es hat den Anschein, als ob ein Uebergang zwischen beiden bestünde.

Fig. 9. Hund. Ganglienzelle. Ammonshorn. Lyssa. Unna-Pappenheim-Färbung. Anschnitt einer Ganglienzelle ohne Kern. Plasma rotbraun, Negrikörperchen blau mit roten Innenkörperchen.

Fig. 10. Kaninchen. Cornea. Vakzine. Unna-Pappenheim-Färbung. Guarneri-Körperchen blau mit roten Innenkörperchen.

Fig. 11. Kaninchen. Cornea. Herpes. Unna-Pappenheim-Färbung. Herpeskörperchen rechts oben indifferent gefärbt, im anderen Kern ein blau gefärbter „Einschluß".

Fig. 12. Mensch. Ganglienzelle. Substantia nigra. Encephalitis epidemica. Unna-Pappenheim-Färbung. Plasma rotbraun. Pigment braun. Lipoide Substanz blau. Daneben 2 Plasmazellen.

Fig. 13. Mensch. Ganglienzelle. Schleife. Encephalitis epidemica. Unna-Pappenheim-Färbung. Das Abnützungspigment erscheint hier als blauer Punkt mit hellem Hof.

Fig. 14. Mensch. Ganglienzelle. Schleife. Encephalitis epidemica. Lentz-Färbung. Das Pigment gelblich, in demselben rote Innenkörperchen.

Literatur.

Aschoff, L. (Anitschkoff), Zur Frage der tropfigen Entmischung. (Verhandl. d. D. Path. Ges. 1914.) — Blanc, G., u. Caminopetros, J., Recherches expérimental. sur la neurovaccine. (Compt. rend. Soc. de Biol. T. 88. p. 1020.) — Dies., Recherches expériment. sur la vaccine. (Ebenda. T. 89. p. 38.) — Dies., Recherches expériment. sur la vaccine. (Arch. de l'Inst. Pasteur Hellénique. T. 1. 1924. No. 2.) — Doerr, R., u. Zdansky, Kritisches und Experimentelles zur ätiolog. Erforschung d. Herpes febr. und d. Encephalitis leth. (Ztschr. f. Hyg. Bd. 102. 1924.) — da Fano, C., A preliminary note of the histo-pathol. of epidem. (letharg.) encephalitis. (Brit. med. Journ. January 29th. 1921.) — Fuchs, A., Experimentelle Encephalitis. (Wien. med. Woch. 1921. Nr. 16.) — Halberstädter, Trachom und Chlamidozoenerkrankungen der Schleimhäute. S. v. Prowazek, Handbuch der path. Protozoen 1.) — Herzog, G., Zur Pathologie der Encephalitis ep. (Verhandl. d. D. Pathol. Gesellsch. 18. Tagung. 1921.) — Husler, J., u. Spatz, H., Die „Keuchhusteneklampsie". (Ztschr. f. Kinderheilk. Bd. 38. H. 5.) — Jahnel, F., u. Illert, E., Kritische Untersuchungen zur Aetiologie der epidemischen Encephalitis. (Klin. Woch. 1923. Nr. 37/38.) — Koch, Ernst Walter, Basophile Körnelung und Entkernung der roten Blutkörperchen bei Bleivergiftung. (Virch. Arch. Bd. 225. H. 1.) — Kolle-Hetsch, Allgem. über filtrierbare Krankheitserreger. (Experiment. Bakteriol. Bd. 11. 1922.) — Kuhle, Ueber Vakzineimmunität. (Münch. med. Woch. 1924. Nr. 50.) — Lauda, E., Zur Histologie der herpet. Meningoencephalitis des Kaninchens. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 91. 1923. H. 3/4.) — Lipschütz, B., Untersuchungen über die Aetiologie der Krankheiten der Herpesgruppe. (Arch. f. Dermat. u. Syphil. Bd. 136. Nr. 3.) — Ders., „Herpetischer Zoster"? (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 93. H. 5. — Löwenstein, A., Uebertragungsversuche mit dem Virus d. fieberhaften Herpes. (Klin. Monatsbl. f. Augenheilk. Bd. 64. 1920. Januar.) — Ders., Neuere Ergebnisse der Herpesforschung. (Ber. über d. Vers. der D. Ophth. Gesellsch. Heidelberg 1920.) — Lucksch, Fr., Ueber „Ganglienzelleneinschlüsse" bei Encephalitis ep. v. Economo. (Ziegl. Beitr. Bd. 71. 1922.) — Ders., Blatternimpfung und Encephalitis. (Med. Klin. 1924. Nr. 34.) — Luger, A., u. Lauda, E., Zur Aetiologie des Herpes fibrilis. (Ztschr. f. d. ges. exper. Med. Bd. 24. H. 5/6.) — Dies., „Herpetischer Zoster"? (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 93. H. 6. — Dies., Ungelöste Fragen und aktuelle Probleme auf dem Gebiete d. Herpes. (Wien. klin. Woch. 1925. H. 1.) — Mittasch, G., Ueber die path.-anat. Grundlagen der Encephalit. leth. u. choreat. (Med. Klin. 1921. Nr. 5.) — Neubürger, K., Ueber zerebrale Fett- u. Luftembolie. (Ztschr. f. d. ges. Neurol. u. Psych. Bd. 95. H. 1/2.) — Neumann, R. O., u. Mayr, Martin, Wichtige tier. Parasiten u. deren Ueberträger. München (Lehmann) 1914. — Prowazek, S. v., u. Lipschütz, B., Chlamydozoen. (Prowazek S. v., Handb. d. path. Protozoen I.) — Prowazek, S. v., Vakzine. (Ebenda.) —

Schmaus, H., u. Albrecht, E., Ueber Karyorrhexis. (Virch. Arch. Bd. 138. Supplementh. S. 30.) — Silberstein, F., Experimentelle Encephalitisstudien. (Wien. klin. Woch. 1924.) — Spielmeyer, W., Histopathologie des Nervensystems. Berlin (Springer) 1922. — Stiner, O., Zur Frage der Impfschädigungen. (Schweiz. med. Woch. 1925. S. 244.) — Zdansky, E., Zur path. Anatomie der durch d. Herpes-Encyphalitisvirus erzeugt. Kaninchenencephalitis. (Frankf. Ztschr. f. Path. Bd. 29. 1923.)

Seltener histologischer Befund bei Malaria perniciosa synkopalis.

[Aus der medizinischen Klinik der königl. ungar. Franz-Josef-Universität in Szeged, Ungarn (Direktor Prof. N. von Jancsó).]

Von **R. von Engel.**

Mit 2 Tafeln.

Ende Juli vorigen Jahres wurde ein 24jähriger Knecht von einem benachbarten Dorfe in unsere Klinik gebracht, mit der Anamnese, daß er seit 2 Wochen schwer krank sei. Seitdem hat er ständig Fieber, das aber nicht gemessen wurde. Er ist sehr schwach, seit einigen Tagen hat er öfters Durchfälle gehabt. Der Dorfarzt hat ihn nur einmal gesehen und überwies ihn mit dem Verdacht auf Abdominaltyphus auf die Klinik.

Bei der Aufnahme ist der Puls kaum fühlbar, so daß der Kranke vor der genaueren Untersuchung 0,40 g Kampfer in Injektion bekommt. Als daraufhin der Puls ein wenig voller wurde, konnten wir ihn untersuchen, doch auch da mußten wir jedwede Bewegung vermeiden.

Bei dem mäßig gebauten, kräftigen Menschen fällt eine schwere Zyanose auf, besonders im Gesicht und an den Gliedern. Die Lippen sind auch zyanotisch und fuliginös. Temperatur bei der Aufnahme abends 8 Uhr 37,7 °. Der Kranke ist soporös, adynamisch, Herzdämpfung normal, Herztöne sind leise, verwischt. Puls 130, klein, leer, unregelmäßig, ausbleibend. Mäßiger Bronchialkatarrh. Die Zunge ist schwer belegt, trocken, beim Ausstrecken zittert sie. Der Bauch ist flach, etwas gespannt, überall ein wenig druckempfindlich. Die Milz ist vergrößert, der untere Pol 4 Finger breit unter den Rippenbogen, etwas fester, schmerzhaft. Die obere Grenze der Milzdämpfung ist bei der VII. Rippe. Leber ist nicht fühlbar. Leberdämpfung normal. Im Urin wenig Eiweiß.

Blutuntersuchung: Leukozytenzahl 12 000.

Davon neutrophile segmentkernige	40	Proz.	= 48 Proz.
„ stabkernige	6	„	
„ jungkernige	2	„	
basophile Leukozyten	2	„	
Lymphozyten	33	„	
Monozyten	17	„	

Bei der Untersuchung von nativen und gefärbten Präparaten sehen wir in sehr vielen roten Blutkörperchen kleine Tropenringe, und zwar in vielen auch mehrere auf einmal. Mehr als 1000 Blutkörperchen übersehend, finden wir insgesamt 32,5 Proz. infiziert, davon mit einem Ring 26,4 Proz., mit zwei 4,5 Proz., mit drei 1,4 Proz. und mit vier 0,2 Proz. Nach langem Suchen fanden wir vereinzelt auch Gameten. Sonst zeigen die roten Blutkörperchen leichte Anisozytose, gut ausgesprochene Polychromasie. Wir fanden ziemlich reich auch kernhaltige Blutkörperchen, einige basophil granuliert.

Gleich nach der Feststellung der Diagnose bekam der Kranke nach wiederholten Kampfer-Einspritzungen 1 g Chininum bimuriaticum intravenös. Nach einigen Min. aber zeigen sich in beiden Armen klonische Krämpfe, dabei tritt Herzstillstand ein, die Wiederbelebungsversuche blieben ohne Erfolg.

Die Obduktion geschah 4 Std. nachher: Auffallend starke allgemeine Totenstarre. Die Hautfarbe ist blaß-zyanotisch, am Rücken ausgedehnte, zusammen-

fließende Leichenflecken. In den Blutleitern der harten Hirnhaut sehr viel flüssiges Blut. Kein Symptom von erhöhtem Hirndruck. In den Hirnventrikeln finden wir einige Tropfen Flüssigkeit, die Gehirnsubstanz ist leicht anämisch und zeigt keine Spur von einer abnormen Pigmentierung. Das Herz zeigt starke Leichenstarre, ist normal groß. Die Ventrikel enthalten ein wenig rotes Blutgerinnsel. Die Herzmuskulatur ist braunrot, in guter Konsistenz, die Klappen zeigen keine Veränderung. Lungen ohne pathologischen Befund. Die Milz ist aufs Dreifache vergrößert, die Kapsel stark gespannt, die Substanz ist schokoladenbraun, sehr weich, zerfließt fast breiig, die Follikel und Trabekel sind ganz verwischt. Nieren normal groß, ihre Substanz ist blaß-rötlich, etwas gelb getupft. Die Leber mäßig vergrößert, dunkelgrau-braun, mit gut ausgesprochener Zeichnung. Die Schleimhaut des Dünndarms zeigt viele punktförmige Blutungen. In der Diaphyse der Röhrenknochen findet sich rotes Knochenmark, die Epiphysen zeigen eine dunkelgraue Zeichnung.

In Ausstrichpräparaten der Milzpulpa finden wir nebst den verschiedensten lymphoiden und myeloiden Zellen sehr viele rote Blutkörperchen, teils auch kernhaltige. Reichlich ist auch der Parasitenbefund. Ein sehr großes Prozent von den Blutkörperchen ist mit Ringformen und mit verschieden entwickelten Amöboidformen infiziert, wir finden zahlreiche Teilungsfiguren und reichlich Gameten nebst massenhaftem Pigment.

Der Obduktionsbefund zeigte also charakteristische, auf Malaria hinweisende Veränderungen. Es gab aber keine Erklärung für die auffallende Herzschwäche, die während unserer kurzen Beobachtung das ganze klinische Bild beherrschte.

Bei der histologischen Bearbeitung des Falles haben wir alle Organe in Serienschnitten untersucht, mit Hämatoxylin-Eosin, Giemsa und polychrome Methylenblau-Färbung. Nebst den histologischen Veränderungen haben wir in erster Reihe den Plasmodiengehalt der einzelnen Organe beobachtet, um festzustellen, wo die Sporulation stattfand.

Die Milz zeigt mikroskopisch eine starke Vermehrung der Pulpa auf Kosten der Trabekel und Lymphfollikel. Die Pulpa ist sehr blutreich, voll mit massenhaften lymphoiden und myeloiden Zellen. Wir sehen ja das Bild einer akuten, infektiösen Milzschwellung, die histolgischen Merkmale einer chronischen Entzündung fehlen gänzlich. Plasmodien finden wir in den Schnitten überall zerstreut, hauptsächlich Teilungsfiguren, weniger Gameten. Aber ein reichlicheres Vorkommen der Parasiten gruppenweise, so wie das bei Perniciosa-Fällen gewohnte Bild ist, fehlt hier vollkommen. Auffallend reich ist aber der Pigmentbefund, angehäuft in Endothel und große mononukleäre Zellen, häufig in so großem Maße, daß die Zellen nekrobiotisch werden.

Alle anderen Organe, mit Ausnahme des Herzmuskels, zeigten keine auffallenden histologischen Veränderungen. Nur die teils in Endothel-, teils in Wanderzellen angehäuften dunkelbraunen Pigmentkörnchen und die mit Perniciosa-Ringen infizierten Erythrozyten in den Gefäßen zeigten auf Malaria. Teilungsformen fanden wir nirgends.

Viel interessanter war aber der mikroskopische Befund des Herzens. Schon in dem subepikardialen Fettgewebe sahen wir die Kapillarvenen und Kapillaren voll ausgefüllt mit Parasiten, die die verschiedensten Entwicklungsstadien zeigten, von den pigmentlosen kleinsten Ringen bis zu den rosettenförmigen Teilungsfiguren. Viele von denen zerfallen eben in Merozoiten. Die geschwollenen Endothelzellen sind voll von Pigmentkörnchen, die Leukozyten und Monozyten zeigen phagozytiert Pigment, Blutkörperchen-Trümmer und Plasmoiden (Taf. I, Abb. 1). Die größeren Gefäße in der Herzmuskulatur sind infolge der stark ausgesprochenen Totenstarre größtenteils leer. In den einzelnen größeren Venen aber, die noch Blut enthalten, finden wir massenhaft Parasiten,

oft 15—20 Teilungsformen zusammengehäuft, wandliegend, in der Peripherie des Blutstromes, während die Ringe mehr in der Mitte des Stromes zu finden sind (Taf. II, Abb. 2). In noch reichlicherem Maße fanden wir die Parasiten bei der Untersuchung des Kapillarsystems des Myokards. Die Herzmuskulatur hat ja bekanntlich eine außerordentlich reiche Blutversorgung. Die Kapillaren bilden innerhalb der Muskelbündel langgezogene, die Muskelfasern umspinnende Netze und Maschen. In den von den verschiedensten Teilen des Herzens genommenen Schnitten finden wir dieses Kapillarnetz ganz ausgefüllt mit Parasiten. In einzelnen Maschen sind hauptsächlich Ringformen sichtbar, in anderen sind Teilungsfiguren zusammengehäuft, die Endothelzellen enthalten Pigment. Am auffallendsten sind aber die Stellen, wo die Kapillaren sozusagen thrombosiert sind mit massenhaften Merozoiten (Taf. II, Abb. 3 u. 4). Es ist noch bemerkenswert, daß die Herzmuskulatur selbst histologisch ganz intakt ist. Sie zeigt eine gut erhaltene Querstreifung, ist gut färbbar, und wir finden kein Zeichen von irgendeiner Degeneration. Das ist mit dem makroskopischen Befund in gutem Einklang.

In den anderen Organen haben wir, wie schon erwähnt, keine Teilungsformen gefunden.

Die histologischen Veränderungen können wir kurz zusammenfassen. In der Leber ist massenhaft Pigment angehäuft, aber die Leberzellen selbst sind frei davon, es ist fast ausschließlich in den Endothelzellen phagozytiert. Die geschwollenen Kupffer-Zellen sind voll von braunschwarzen Körnchen, einige desquamieren und zeigen schlechte Kernfärbung. Wie stark der Endothelapparat der Leber in Anspruch genommen ist, zeigt gut der Befund der kleineren Lebervenenäste, welche fast voll sind von abgestoßenen, pigmenthaltigen, geschwollenen Endothelzellen. Das interlobuläre Bindegewebe ist in kleinen Inseln vermehrt, zellenreich, mit vielen lympoiden und myeloiden Zellen (Taf. II, Abb. 5). Das rote Knochenmark zeigt eine starke Erythro- und Leukopoëse, enthält mäßig Pigment, Teilungsfiguren aber nicht. Das Gehirn zeigt nur sehr wenig Pigment, sonst keine Veränderung.

So gab die histologische Untersuchung in diesem Falle eine vollständige Erklärung des klinischen Bildes. Die enorm große Anhäufung der Parasiten in den Herzgefäßen, in erster Linie in den Kapillaren, hat zweifellos einen sehr großen Einfluß auf die Blutversorgung der Herzmuskulatur gehabt. Da fanden wir trotz des vollständigen Mangels der histologischen Merkmale einer Herzmuskeldegeneration doch eine vollkommene Erklärung der Herzschwäche und des Herztodes. Sowohl das klinische Bild, wie der histologische Befund des Falles ist sehr selten und kaum bekannt bei Malaria perniciosa. In der letzten Ausgabe von Ziemanns Monographie, welche die ganze Malaria-Literatur der letzten Jahre zusammenfaßt, sind im ganzen nur 3 Fälle erwähnt, wo ein ähnlicher Parasitenbefund die Ursache des plötzlichen Todes war.

Erklärung der Tafelabbildungen.

(Sämtliche Abbildungen sind mit 1000facher Vergrößerung gezeichnet.)

Tafel I.

1) Kapillarvene und Kapillaren in subepikardialem Fettgewebe. Häm.-Eosinfärbung.

Tafel II.

2) Größere Vene im Myokard. Häm.-Eosin-Färbung.
3) Kapillaren im Myokard. Polychrom. Methylenblau-Färbung.
4) Kapillaren mit Sporozoiten ausgefüllt im Myokard. Giemsa-Färbung.
5) Vena hepatica-Ast mit abgestoßenen Endothelzellen. Häm.-Eosin-Färbung.

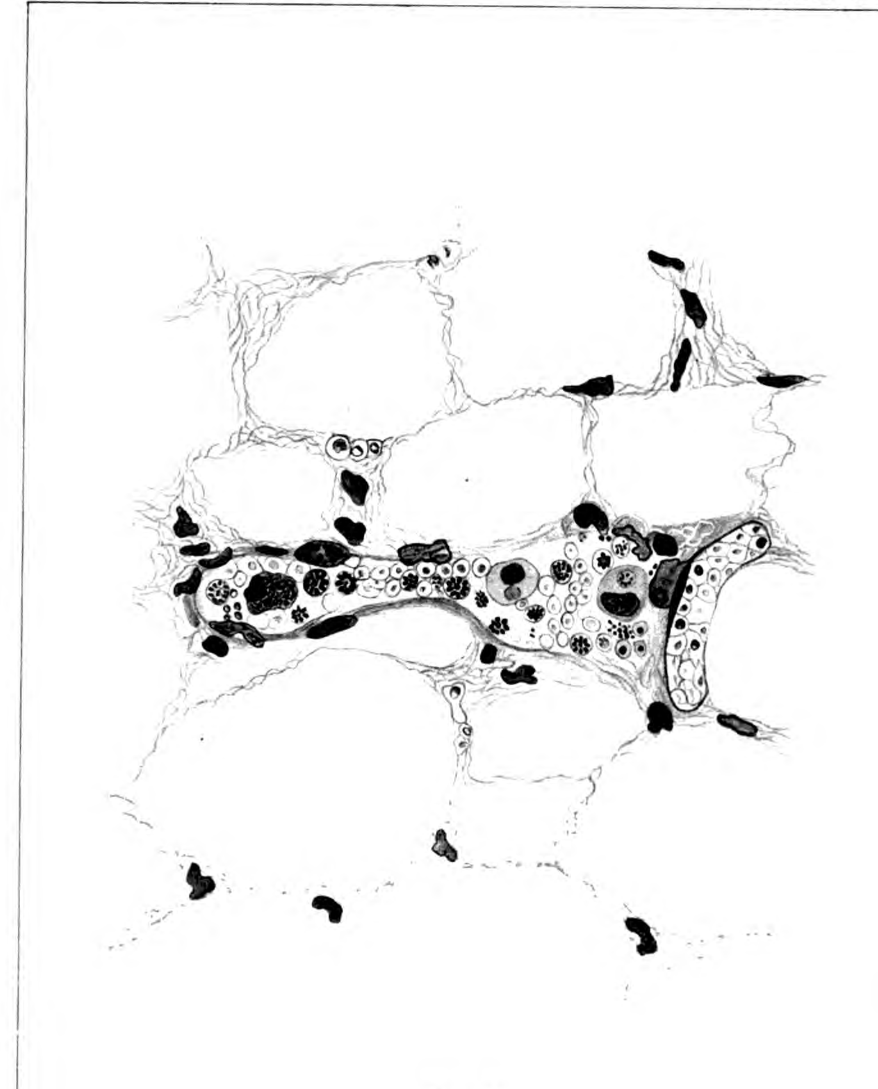
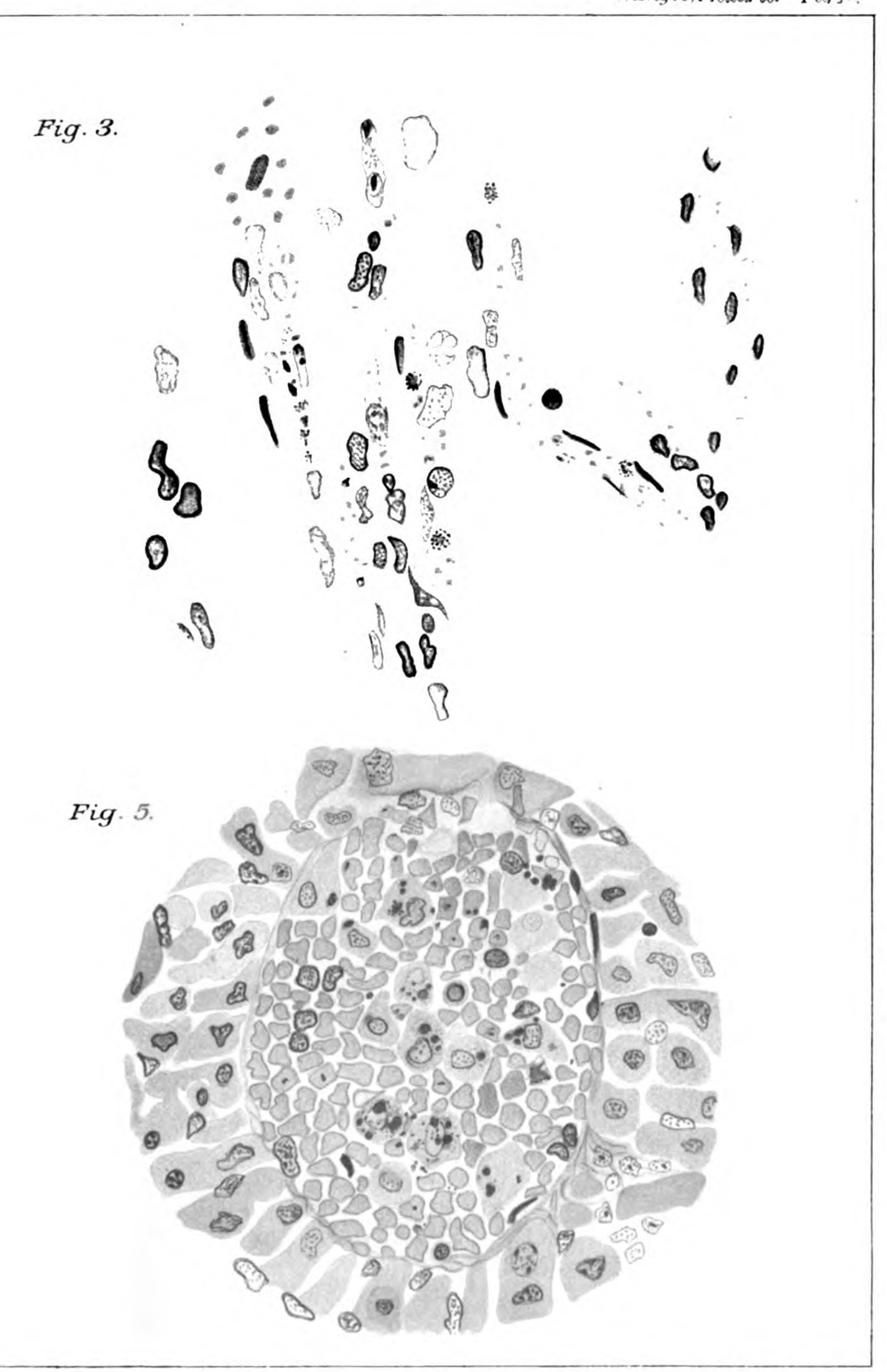


Fig. 1.

Gustav Fischer in Jena


Fig. 2.
Fig. 4.



Jena

Lith. Anst. v Johannes Arndt, Jena

Ueber die Mundflora von Pflanzenfressern und Omnivoren.

[Aus dem Untersuchungsamt für ansteckende Krankheiten beim Hygienischen Institut in Kiel (Leiter: Prof. Dr. L. Bitter).]

Von **L. Bitter** und **M. Gundel.**

In einer Reihe von zahnärztlichen Doktorarbeiten (1—11) ließ Bitter Untersuchungen anstellen über die Flora der Mundhöhle von Meerschweinchen, Ziegen und Schweinen. Diese Untersuchungen dürften zweifellos sowohl für die medizinische Bakteriologie als auch für die Zahnärzte von Interesse sein. Die Kenntnis dieser Flora bietet manches Neue, da derartige Untersuchungen kaum angestellt worden sind, und weiterhin ist — zum Vergleich mit der Mundflora des Menschen — eine genaue Durchuntersuchung bei diesen Tieren erwünscht.

Es sei zunächst auf die Untersuchungsergebnisse beim Meerschweinchen eingegangen, bei denen wir in der Besprechung im Rahmen dieser Arbeit die aëroben von den anaëroben Bakterien trennen wollen. Zur Orientierung wurde zunächst die Flora von 15 Meerschweinchen durchuntersucht und späterhin die Flora in Berücksichtigung des Einflusses, den die Kost auf die Bakterienflora ausübt.

Neben den kulturellen Untersuchungen wurden gleichzeitig direkte mikroskopische Ausstrichprüfungen vorgenommen. Es zeigte sich, daß im direkten Ausstrich bei über 20 Versuchstieren ein ziemlich gleichmäßiges Ergebnis erzielt wurde. Es wurde im allgemeinen ein starkes Ueberwiegen von grampositiven, durchweg mittelgroßen Mikrokokken, die man nach ihrer Lagerung als Staphylokokken ansprechen muß, festgestellt. Sie wurden bei fast allen Tieren in nennenswerten Mengen, bei vielen in so großen Mengen gefunden, daß sie das mikroskopische Bild beherrschten. Spärlicher, aber ebenso oft zeigten sich plumpe grampositive Stäbchen, die ihrem Aussehen nach den Eindruck von Erdbazillen machten, eine Vermutung, die die Kulturergebnisse bestätigten. Nicht selten, aber nur vereinzelt, wurden ziemlich plumpe, gramnegative Semmelkokken beobachtet, die größer waren als Meningo- und Gonokokken, aber auch als die beim Menschen üblichen Vertreter der Catarrhalisgruppe. Daneben fand sich nicht so häufig eine Gruppe von durchweg mittelgroßen grampositiven Kokken, die kugelig waren, vereinzelt lagen und durchweg eine Anordnung zu zweien zeigten. Wir möchten sie an dieser Stelle als uncharakteristische Diplokokken bezeichnen, da sie sich kulturell ebensogut als Staphylokokken wie auch als Streptokokken erwiesen, oder aber als typische Sarzinen wuchsen. Ebenso oft wie diese uncharakteristischen Diplokokken fanden sich Lanzettkokken vom Aussehen und der Größe der Pneumokokken. Sie lagen immer vereinzelt, zeigten nie Kettenbildung, ließen aber das Vorhandensein von Kapseln vermissen. Sie wurden damals nach ihrem kulturellen Verhalten als pleomorphe Diplostreptokokken angesprochen. Leider ist nicht geprüft worden, ob Milchsäurestreptokokken oder echte (pathogene) Diplostreptokokken vorgelegen haben. Daß echte Diplostreptokokken beim Meerschweinchen vorkommen können, beweist der weiter unten mitgeteilte Fall. Angehörige der Diphtheriegruppe, und zwar Diphtheroide, wurden nicht selten beobachtet. Sie hatten das typische Aussehen der Diphtheroiden und lagen oft in Häufchen von

6—10 Stück zusammen in hübschen V- und Palisadenformen. Die Neissersche Körnchenfärbung ergab in jedem Fall ein negatives Resultat. Des weiteren wurden gramnegative Stäbchen (zur Coli-Gruppe zu rechnen) und besonders plumpe und längere gramnegative Stäbchen beobachtet, die zur Friedländer und Aërogenes-Gruppe gerechnet werden müssen. Bei einigen Tieren wurden Sproßpilze gefunden, und zwar ziemlich große, rundlich-ovale Sproßzellen, die nach ihrer Gestalt in die Gruppe der Saccharomyzeten zu gehören schienen. Niemals konnten neben den Sproßpilzen Myzelfäden nachgewiesen werden, so daß die Frage, ob es sich hier um Soor handeln könnte, offen bleiben muß, um so mehr als auf den Spezialnährböden niemals eine Sproßzellenkolonie gefunden wurde. Außerordentlich selten waren die bei 2 Tieren gefunden sog. Leptothrix-Fäden.

Was nun die Ergebnisse der kulturellen Untersuchungen anbetrifft, so darf auf die Zusammenstellung in der Tabelle I hingewiesen

Tabelle I.

Gefundene Arten bei	Gruppe					
	I	II	III	IV	V	VI
	von Tieren					
1) Staphylokokken	16	20	2	10	4	4
davon Staph. citreus	1	.	.	.	.	.
„ „ albus	1	.	.	.	.	.
2) Streptokokken	13	14	2	8	1	3
davon Strept. pyogenes	3	3	.	3	.	.
„ „ pleomorphus	8	11	2	5	1	3
3) Gramnegative Semmelkokken	11	10	2	4	.	4
4) Sarzinen	9	2	.	.	2	.
davon Sarcina lutea	2	1	.	.	1	.
5) Gramnegative Stäbchen (Coli-Gr.)	8	14	.	9	4	1
davon B. coli comm.	5	13	.	8	4	1
„ „ „ „ haem.	1	1	.	1	.	.
6) Gramnegative Stäbchen (Friedländer-Gruppe)	1	.	.	.	.	.
7) Grampositive Stäbchen (Diphtheroide)	10	11	2	8	0	1
8) „ „ (Sporenbildner)	3	14	2	8	.	4
9) Bact. ochraceum	1	2	.	2	.	.
10) „ prodigiosum	1	7	.	3	4	.
11) Leptothrix	1	1	.	.	.	.
12) Schimmelpilze	21	20	2	10	4	4

Erklärung zur Tabelle I:
Gruppe I: 21 Tiere gemischte Kost: Heu, Hafer, Steckrüben,
„ II: 20 „ , „ „ : Kontrollversuch zu Gruppe I,
„ III: 3 „ , Hartfutter,
„ IV: 10 „ , Gras- und Steckrübenfütterung,
„ V: 4 „ , Fütterung mit gekochten Kartoffeln,
„ VI: 4 „ , (dieselben wie V), Hartfutter.

werden. Es geht aus der Aufstellung I hervor, daß die Staphylokokken außerordentlich häufig vertreten waren, aber nur zweimal einwandfreie Angehörige der pathogenen Unterarten. Gar nicht selten wurden Staphylokokken gefunden, die besonders auch auf Chinablauagar den charakteristischen, schönen goldgelben Farbton aufwiesen, ohne jedoch jemals eine Hämolyse zu zeigen, so wie wir sie außerordentlich häufig bei Staphylokokken aus der Mundhöhle des Menschen sehen. Des

weiteren fehlte die Verflüssigung der Gelatine (siehe Engeland, Centralbl. f. Bakt. Orig. Abt. I. Bd. 72), auf welches Vermögen der eine von uns (G.) noch in einer besonderen Arbeit zurückkommen wird. Das Säurebildungsvermögen aus Milchzucker war gering. Der Albus- wie auch der Citreus-Stamm waren dagegen typisch.

Eingegangen werden darf noch auf die gramnegativen Semmelkokken, die in der 1. Gruppe 11mal und in der 2. 10mal gefunden wurden. Die Kolonien vergrößerten sich bei Aufenthalt in Zimmertemperatur noch beträchtlich; es handelte sich jedesmal um weißgraue, rundliche, gewölbte Kolonien mit unregelmäßigem Rand. Sie zeigten mikroskopisch das Aussehen von Gono- und Meningokokken, waren aber nach der Gramfärbung auch bei vorsichtiger Anwendung von Alkohol nicht darzustellen. Wir dürften nicht fehlgehen, wenn wir sie als Angehörige der Micrococcus catarrhalis-Gruppe bezeichnen. Da auch in gesunden menschlichen Luftwegen der Micrococcus catarrhalis außerordentlich häufig ist, dürfte sein zahlreiches Vorkommen auch auf der Mundschleimhaut der Meerschweinchen nicht wundernehmen. Besonders häufig ist das Vorkommen von gramnegativen Semmelkokken bei Hartfutter und auffällig das Fehlen dieser Mikroorganismen bei Weichfutter. Bei mittelhartem Futter fanden sie sich in etwa der Hälfte der Fälle.

Bei den Streptokokken wäre zu erwähnen, daß sich der typische Streptococcus pyogenes mit Hämolyse nur in je 3 Fällen bei den Gruppen I und II züchten ließ, gänzlich aber bei weicher und harter Fütterung fehlte, dagegen bei mittelharter Kost wieder in 3 Fällen auftrat. Die Größe der Streptococcus-Kolonien war im allgemeinen sehr gering; es handelte sich um bis zu kleinstecknadelkopfgroße, meist ziemlich trockene, unregelmäßig gerandete, bei schwacher Vergrößerung mit zarten Ausläufern versehene Kolonien. Auf Chinablau waren sie sehr klein und zeigten meistens keine wahrnehmbare Säuerung. Sie zeigten mikroskopisch mittelgroße runde Streptokokken ausnahmslos in Gliedern von über 6, die im einzelnen recht gleichartig waren. Es fanden sich also die typischen Streptokokken in der Mundhöhle der Meerschweinchen außerordentlich selten. Prüfungen über die Pathogenität sind leider aus Mangel an Versuchstieren nicht angestellt.

Recht interessant ist der in Gruppe I und II erhobene Befund vom sog. Streptococcus pleomorphus (s. o.) in 8 bzw. 11 Fällen. Der „Streptococcus pleomorphus“ wuchs auf Blutagar als flache, rundliche, kleine oder mittelgroße, etwas schleimige Kolonie. Im mikroskopischen Bilde zeigte er in überwiegender Häufigkeit Lanzettformen und starke Neigung zur Kettenbildung, wobei auch zuweilen runde oder rundliche Formen auftraten. Was die Größe der einzelnen Glieder anbetrifft, so fiel das außerordentlich wechselnde Bild auf. So fanden sich oft in einer Kette die verschiedenartigsten Gestaltenübergänge von ausgesprochener Lanzettform zu vollendeter Kugelform bei sehr wechselnden Größenverhältnissen. Die Ketten selbst durchliefen nicht selten mehrere Gesichtsfelder. Da die Kokken auf Blutagar nur mit einer geringen Aufhellung, aber deutlicher Vergrünung wuchsen, sind sie damals als Streptococcus pleomorphus bezeichnet worden, ein Mikroorganismus, der seit der großen Grippeepidemie 1918 so sehr häufig auf der Mund- und Rachenschleimhaut Gesunder und an Grippe Erkrankter gefunden wird. Es war interessant, zu sehen, daß dieser

Mikroorganismus auch beim Tiere auf den Schleimhäuten nicht gerade selten zu finden ist, ein Befund, der durch das Sektionsergebnis eines während der Untersuchungen verendeten Meerschweinchens bestätigt wurde. Es wurde eine verhältnismäßig kleine Pneumonie des rechten Unterlappens gefunden, die zu einer eitrigen Pleuritis von mäßigem Umfang Veranlassung gegeben und an die sich eine Herzbeutelentzündung mit mächtigem eitrigen Exsudat angeschlossen hatte. In dem steril entnommenen Pleura- und Herzbeutelexsudat sowie in dem pneumonischen Lungenlappen wurde ein Streptococcus pleomorphus in Reinkultur nachgewiesen, ein Beweis, daß auch auf den Schleimhäuten der Meerschweinchen dieser Mikroorganismus nicht nur saprophytisch vorkommt. Es darf noch erwähnt werden, daß das verendete Tier mit den übrigen monatelang zusammen lebte, daß aber dieser Fall vereinzelt blieb. Inwieweit es sich bei unseren Lanzettkokkenbefunden um Milchsäurestreptokokken gehandelt hat, ist jetzt nicht mehr festzustellen. Durch die neueren Arbeiten, insbesondere auch durch eigene Untersuchungen (Bitter u. Buchholz, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 95. 1925, und Gundel, ebenda) steht ja fest, daß in der Mundhöhle des Menschen Milchsäurestreptokokken mit ausgesprochenem Pleomorphismus häufig, um nicht zu sagen immer, angetroffen werden. Immerhin beweist der mitgeteilte Fall das Vorkommen des echten, bei der letzten Grippeepidemie als Nosoparasit beobachteten Lanzettcoccus beim Tiere. Bei den verschiedenen Fütterungen wurde der Streptococcus pleomorphus nur einmal bei den weich gefütterten, hingegen bei den hart- und mittelhart gefütterten Tieren durchweg in der Hälfte der Fälle gesehen.

Angehörige der Pseudodiphtheriegruppe wurden relativ oft — in etwa der Hälfte der Fälle — gefunden. Sie verhielten sich auf den Platten und im mikroskopischen Bilde durchaus typisch, so daß sie hier nicht näher behandelt werden brauchen. Im Tierversuch erwiesen sie sich sämtlich als apathogene Diphtheroide. Farbstoffbildung, die in dieser Gruppe nicht selten ist, ist nur bei einem Stamm, der lebhaft goldgelb wuchs, gesehen worden. Bei hart gefütterten Tieren wurden Diphtheroide 3mal, bei mittelhart gefütterten 8mal und bei weich gefütterten gar nicht beobachtet. Auffällig ist, daß bei Hartfütterung die Neisser-Färbung der gezüchteten immer positiv war, wohingegen sie in den Gruppen I und II negativ ausfiel.

Interessant muß erscheinen, daß bei der Heufütterung in der Gruppe I nur 3mal Sporenbildner (Kartoffel- und Heubazillen) gezüchtet wurden, während sie in den direkten Ausstrichen häufiger gesehen wurden. Bei Weichfütterung ließen sie sich jedesmal kultivieren, bei mittelharter noch 8mal, bei harter Fütterung nur 2mal. Es will scheinen, als ob die mit dem Heu- und Stallstaub aufgenommenen Sporenbildner nur gute Existenzbedingungen in den Mundhöhlen weich gefütterter Tiere finden.

Colibakterien, und zwar typische, die den Milchzucker säuerten, aus Traubenzucker Gas, aus Peptonwasser Indol bildeten, wurden relativ oft beobachtet. Das Vorkommen erklärt sich wohl leicht durch die Verunreinigung des Futters mit dem Kot der Tiere. Auch beim Menschen sind ja Coli-Bakterien in der Mundhöhle keine Seltenheit. Bei Weichfuttertieren wurden sie jedesmal, fast immer — 9mal — bei mittelhart gefütterten und nur einmal bei hart gefütterten Tieren gefunden.

Fünfmal wurde das Bacterium ochraceum gefunden, das zu-

nächst auf den Schalen durchaus den Eindruck von Typhusbakterien macht. Es handelt sich mikroskopisch um grampositiv-negative, bewegliche Stäbchen. Sie bilden aber nach der der Bebrütung folgenden 24stünd. Aufbewahrung bei Zimmertemperatur einen ockergelben Farbstoff. Da feststeht, daß dieser Mikroorganismus in der Luft und auf der Haut sehr häufig vorkommt, ist auch sein Erscheinen in der Mundhöhle von Meerschweinchen nicht verwunderlich.

Ebenso darf das Auftreten von Bacterium prodigiosum nicht wundernehmen, wenn man sich vergegenwärtigt, daß es ein relativ häufiger Bewohner des Darmes ist. Interessant ist nur wieder, daß das Stäbchen sich in jedem Fall bei Weichfütterung fand.

Auf allen angelegten Kulturen wuchsen Schimmelpilze, verhältnismäßig selten Mucorarten. Nicht selten entwickelten sich die Aspergillusarten schon bei 37 ^{0}. Bei dem bekannten reichen Gehalt der Stalluft an Schimmelpilzsporen sind diese Befunde leicht zu erklären.

Bei der Durchsicht des Materials dürfte der Umstand auffallen, daß niemals Protozoen, aber auch niemals Spirochäten angetroffen wurden. Auf einen Mangel der Technik ist u. E. das Versagen des Spirochätennachweises nicht zurückzuführen. Es ist schwer, bei lebenden Meerschweinchen mit einem Tupfer oder einer Platinöse andere Zähne als die vorderen 4 Nagezähne zu erreichen, und man könnte annehmen, daß etwa vorhandene Spirochäten sich vorzugsweise an den anderen, weit rückwärts liegenden Zähnen befinden. Deshalb sind bei 10 frisch getöteten normalen Tieren unmittelbar nach dem Tode die Hinterzähne durch Präparation freigelegt und untersucht worden. Aber auch so gelang in keinem Fall der Nachweis auch nur einer Spirochäte.

Fassen wir die Ergebnisse zusammen, so ergibt sich auf der einen Seite ein ausgesprochener Parallelismus zwischen der Flora auf den Mundschleimhäuten der Menschen und Meerschweinchen — man denke an das Vorkommen von Streptokokken, Diplostreptokokken, Diphtheroiden usw. —, während auf der anderen Seite ein nicht unerheblicher Unterschied festzustellen ist. Das Fehlen der Spirochäten, des Bacterium fusiforme u. a. sind Gründe für die letzte Behauptung. Der Einfluß der Fütterung auf die Flora ist zum Teil recht einleuchtend. Was die Keimzahl anbetrifft, so darf hier hervorgehoben werden, daß die Menge der Mikroorganismen bei weicher Fütterung enorm zunahm, und zwar bei vorsichtiger Schätzung um etwa das 10fache. Weiter ist interessant, daß bei weicher Fütterung die Säurebildner, z. B. die Vertreter der Coli-Gruppe, erheblich zunahmen, ein Befund, der für den Zahnarzt wegen der Beziehungen der Säurebildner zur Zahnkaries von besonderer Bedeutung sein dürfte.

Die Untersuchungen über das Vorkommen von Anaërobiern in der Mundhöhle von Meerschweinchen sind mit Hilfe des Heim-Lentzschen Verfahrens durchgeführt worden. Die Ausstriche wurden auf Blut- und Chininblauagar gemacht, und die Platten blieben für 48 bis 72 Std. im Brutschrank bei 37 ^{0}. Die Forderungen nach einer genauen Klassifizierung der in der ersten Aussaat gewachsenen Keime ließen sich nicht immer erfüllen, da die geringe Lebensfähigkeit, ferner das Ueberwuchern von Begleitbakterien nach dem Oeffnen der anaëroben Kulturen bei manchen Keimen nicht zu überwindende Schwierigkeiten darstellen. So konnte denn oft nicht das Indolbildungsvermögen, das Säure- und Gasbildungsvermögen aus verschiedenen Zuckern genau unter-

sucht werden. Einen Fingerzeig für die ergebnislosen Versuche zur Feststellung des Gasbildungsvermögens von Kokken bietet wohl dieser Fall: Von einem anaëroben Streptococcus putridus sowohl von einer Ziege als auch von einem Meerschweinchen wurde zu gleicher Zeit eine Stichkultur in Traubenzuckeragar angelegt. Erst nach 10 Tagen ließ sich eine schwache, zur Kontinuitätstrennung der erstarrten Agarsäule führende Gasbildung feststellen, und wir gehen in der Annahme wohl nicht fehl, daß der von uns eingehaltene Zeitraum von 4—6 Tagen zur Prüfung des Gasbildungsvermögens durchaus nicht ausreichend war. Bei dem Fahnden nach obligaten Anaërobiern stößt man weiterhin häufig auf Mikroorganismen, die in der ersten Zeit der Untersuchung starkes anaërobes Wachstum erkennen lassen und auf den aëroben Kulturschalen nicht angehen, später aber doch aërob wachsen. Die fakultativen, die übrigens häufig gefunden wurden, sind, mit Ausnahme von 2 besonders üppig gewachsenen, hier nicht aufgeführt worden.

Wenn wir jetzt auf die gefundenen Keime eingehen, so seien zunächst die Staphylokokken besprochen. Unter den obligaten Anaërobiern konnten nur sehr selten gramnegative Staphylokokken gefunden werden. Interessant ist, daß sie niemals bei den Meerschweinchen mit weichem Futter, hingegen wohl bei solchen mit hartem und mittelhartem Futter gesehen wurden, ein Befund, der ein Analogon findet in dem oben besprochenen Vorkommen gramnegativer Semmelkokken bei der II. und dem Fehlen bei der I. Fütterungsgruppe.

Unter den 10 streng anaërob wachsend gefundenen Streptokokken verdient der als Streptococcus putridus (Schottmüller) klassifizierte wohl die größte Beachtung. Die Vermutung, daß es sich bei den in Frage stehenden Mikroorganismen um den Strept. putridus handelte, wurde schon beim Oeffnen der Kulturschale gestützt durch einen leichten, aber deutlich wahrnehmbaren putriden Geruch. Die kulturellen Befunde stimmten auch vollkommen mit den von Schottmüller und später von Juhl (Inaug.-Diss. Kiel, 1920) gemachten überein. Weiterhin wurden zuweilen typische Vertreter von Strept. pleomorphus gefunden, die oben auch schon gestreift worden sind. Auffällig ist, daß sie hier unter anaëroben Bedingungen gut wuchsen, daß sie aber aërob nicht gezüchtet werden konnten. Einmal gelang es auch, einen hämolysierenden, obligat anaëroben Strept. zu finden mit schöner Kettenbildung von 4—12 Mikrokokken, die zuweilen eine Anordnung zu zweien erkennen ließen. Schließlich seien noch 2 Streptokokkenarten erwähnt, die wir als fakultative Anaërobier ansprechen möchten. Sie wuchsen anaërob etwas üppiger als aërob. Der eine Typ zeigte kürzere Ketten (4—8 Glieder) und wuchs anhämolytisch, der andere hatte 10—20 und mehr Glieder und ließ deutliches Hämolysierungsvermögen erkennen.

Zum Schluß finde noch ein interessanter Befund Erwähnung. Es handelt sich um ein gramnegatives Stäbchen, das zweifellos zu der Keuchhustengruppe gehört. Ohne auf die Aetiologie des Keuchhustens und die Bedeutung des Bordet-Gengouschen Stäbchens für die Erkrankung näher einzugehen, ist es interessant, hervorzuheben, daß dieses ja beim Menschen öfter einmal ohne ätiologische Bedeutung gefundene Stäbchen auch beim Tiere vorkommen kann. Besonders ist das anaërobe Wachstum auffällig. Es darf an dieser Stelle wohl auf einen ähnlichen Fall hingewiesen werden, wo aus der Leiche eines Phthisikers ein influenzaähnliches Stäbchen gezüchtet wurde, das aber

streng anaërob wuchs (Beck, Kolle-Wassermann. Bd. 3). Kulturell und morphologisch darf betont werden, daß die feinen, tautropfenartigen Kolonien auf Blutagar nach 48 Std. gerade eben erkennbar waren, daß die Stäbchen etwas kürzer und etwas dicker als Influenzabakterien aussahen, daß sie unbeweglich, gramnegativ und von deutlicher Rautenform waren. Nach 3 Tagen kam es in den Schüttel- und Stichkulturen in Blutagar zu einer ausgeprägten Gasbildung. Auf der Blutagarschale ließ ein schmaler Hof Hämolysierungsvermögen erkennen.

Wenden wir uns jetzt zu der zweiten Untersuchungsreihe, nämlich der Untersuchung von Ziegen. Wir werden uns hierbei kurz fassen können. Die Aërobier, die bei 7 Tieren aus der Mundhöhle gezüchtet wurden, lassen sich in diese Aufstellung zusammenfassen:

Es fanden sich Staphylokokken	bei 7 Tieren
Davon	
Pyogenes albus	„ 1 Tier
Streptokokken	„ 3 Tieren
Grampos. Diplokokken	„ 3 „
Grampos. Stäbchen (Diphtheroide)	„ 5 „
Grampos. Stäbchen (Sporenbildner)	„ 7 „
Gramnegative Stäbchen (Coli)	„ 5 „
Sproßzellen	„ 5 „
Leptothrixfäden	„ 3 „
Sarcina lutea	„ 3 „
Spirochäten	„ 1 Tier.

Die Tiere hatten das gleiche Futter (Heu und Gras) erhalten. Eine Vermehrung der obligaten Anaërobier in der Weichfutterzeit bei Ziegen konnte nicht beobachtet werden. Dagegen schien die Zahl der fakultativ anaërob wachsenden Bakterien in der Grünfutterzeit vermehrt zu sein. Bei der Untersuchung auf Anaërobier bei Ziegen wurde die Beobachtung gemacht, daß ein großer Teil der in der Mundhöhle vorkommenden, aërob wachsenden Mikroorganismen: Staphylokokken, Streptokokken, Diplostreptokokken, gramnegative Semmelkokken, aber auch grampositive und gramnegative Stäbchen unter anaëroben Bedingungen ein üppigeres Wachstum erkennen lassen als bei ungehindertem Zutritt von Luftsauerstoff. Dies ist praktisch nicht ohne Bedeutung; denn diese Beobachtung besagt uns, daß, wenn durch Zugrundegehen von organischer Substanz in der Mundhöhle, z. B. durch reichliche Speisereste, an den Zähnen viel Sauerstoff absorbiert wird, die Wachstumsbedingungen einer großen Reihe von Mikroorganismen verbessert werden. Unter diesen anaërob wachsenden Bakterien waren auch Säurebildner, was für das Zustandekommen der Karies nicht belanglos sein dürfte. Das beobachtete Anwachsen der Bakterienmengen bei weicher Fütterung (besonders auch bei Meerschweinchen) kann wohl durch zwei Umstände erklärt werden: 1) ganz allgemein durch die durch die reichlichen Speisereste geschaffenen anaëroben Verhältnisse, und 2) durch den Kohlehydratreichtum.

Ein interessanter Befund darf besondere Erwähnung finden. Zwar nicht immer reichlich, aber ziemlich regelmäßig wurden Fäden gefunden, die den Eindruck von aneinander gereihten Sarzinen machten. Diese Befunde sind in den Jahren 1919 und 1920 erhoben worden. 1922 hat H. Simons (Centralbl. f. Bakt. Orig. Abt. I. Bd. 88. 1922) diese Fäden näher beschrieben. Es handelt sich um Oscillarien, und zwar wahrscheinlich um Simonsinella Mülleri. Bemerkenswert erscheint uns noch der Umstand, daß es gelang, in Traubenzuckeragar (hohe Schicht), also unter anaëroben Bedingungen, die Cyanophycee zur Entwicklung zu bringen.

Gramnegative, obligat anaërobe Kokken wurden vermißt; 3 obligat anaërobe Staphylokokken waren alle grampositiv. Obligat anaërobe Streptokokken wurden in einem Falle beobachtet, wobei es sich wahrscheinlich um den Streptococcus putridus handelte (er wuchs ohne Hämolyse, zeigt aber deutlich putriden Geruch und entwickelte reichlich Gas nach 8—10 Tagen). Des weiteren wurde ein streng anaërober Diphtheroider gefunden.

Zum Schluß wenden wir uns jetzt zu der dritten Untersuchungsreihe, der Untersuchung der Mundhöhle von Schweinen. Die Versuche wurden vor allem auf Omnivoren ausgedehnt, weil diese ja in bezug auf ihre Bezahnung und Nahrung den Menschen am nächsten stehen. Untersucht wurden im ganzen 20 Tiere.

Zur Untersuchung auf Anaërobier wurden die Abstriche von jungen und alten Tieren teils von den Molaren, teils von den Incisivi mittels eines sterilen Tupfers entnommen. Fassen wir die Ergebnisse der Untersuchungen der direkten Ausstriche kurz zusammen, so sehen wir ein starkes Ueberwiegen von grampositiven Staphylokokken bei jedem Tier, in der Hälfte der Fälle finden wir Angehörige der Diphtheriegruppe, und zwar Diphtheroide, bei der gleichen Zahl sichere Streptokokkenketten von mehreren Gliedern (also häufiger als beim Meerschweinchen), und zarte, gramnegative Stäbchen, die wohl zu der Coli-Gruppe gehören. Von dem einen Untersucher wurden auch gramnegative Semmelkokken häufiger gesehen, von dem anderen jedoch immer vermißt, recht häufig aber von beiden der Streptococcus pleomorphus.

Was die kulturellen Ergebnisse anbetrifft, so ist folgendes zu sagen:

Bei jedem Tier konnten die Staphylokokken in reichlichen Mengen nachgewiesen werden. Die pathogenen Vertreter dieser Gruppe fehlten. Allerdings wuchsen auch auf jeder Kultur Staphylokokken, die den typischen goldgelben Farbstoff hatten, ohne aber eine Hämolyse zu zeigen. Es muß uns wundern, daß der Staphylococcus pyogenes aureus ein so seltener Gast in der Mundhöle der Schweine ist, um so mehr, als er in der Mundhöhle des Menschen gar nicht so oft vermißt wird. Gleich auffällig ist das Fehlen der gramnegativen Semmelkokken. Ebenso ist das Fehlen von Streptokokken ohne Hämolyse in diesen Versuchsreihen und das häufige Vorkommen des typischen Streptococcus pyogenes interessant. Ebenso zahlreich wurde der „Streptococcus pleomorphus“ beobachtet, ein Befund, der sehr den gleichzeitigen Befunden beim Menschen ähnelt. Von den anderen Resultaten möchten wir nur noch auf die Züchtung von fusiformen Bakterien hinweisen. Es handelte sich um eine winzig kleine, grauschwarze Kolonie ohne Hämolyse, die aus fusiformen Bakterien bestand. Der mikroskopische Befund des direkten Ausstriches zeigte ebenfalls fusiforme Bakterien. Befremden muß das Auftreten dieser Kolonie in einer aëroben Aussaat. Es ist ja vielleicht denkbar, daß bei der ersten Aussaat einige Nahrungsreste mit auf die Schale gekommen wären, die durch Absorption von Luftsauerstoff den unmittelbar daneben oder darunter liegenden fusiformen Bakterien das Wachstum ermöglicht hätten. Es war nicht möglich, weitere Untersuchungen über diesen Befund anzustellen, da die Keime weder aërob noch anaërob weiter zu züchten [illegible]gen. Schließlich ist noch interessant das Vorkommen der Wanderer- [illegible] Bacillus migrans Bitter (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. [illegible] wobei es sich wohl um eine Abart handelt, da er

nur auf Blutagar wuchs, während der gewöhnliche Wandererbazillus auf allen gebräuchlichen Nährböden gut gedeiht.

Recht ausführlich und genau sind Untersuchungen angestellt worden über das Vorkommen von Spirochäten in der Mundhöhle von Schweinen. Es fragte sich, ob die bei den Pflanzenfressern vermißten Spirochäten (sie wurden nur einmal bei einer alten Ziege in ganz spärlichen Mengen gesehen) ebenfalls bei den Schweinen nur selten angetroffen würden. Es wurden im ganzen über 50 Tiere untersucht. Bei 28 Tieren wurde unmittelbar nach dem Tode mittels einer sterilen Oese das Material entnommen, nachdem das Schwein durch eine Kranvorrichtung in eine besonders günstige Stellung gebracht war. Das Material wurde dann an Ort und Stelle in einem Tropfen Tusche (Burri) verrieben und auf dem Objektträger verstrichen. Mit diesen 28 Untersuchungen wollen wir uns speziell hier beschäftigen. Die Einteilung der Spirochäten wurde nach der Angabe von Mühlens (Kolle-Wassermann) in Spir. dentium, media und buccalis vorgenommen. Es wurden bei diesen 28 Tieren Abstriche von den Zähnen (meist den unteren Incisivi), Zahntaschen und Tonsillen gemacht. 13mal sind keine Spirochäten gefunden worden, wobei es sich um junge Tiere mit sehr guten Zähnen handelte. In 2 Fällen (auch bei jungen Tieren mit gutem Gebiß) wurden viele Spirochäten gesehen. Man findet ja auch beim Menschen mit gutem Gebiß selten viele Spirochäten, in der Regel nur bei solchen mit ungepflegtem und mit Karies, bei denen durch das Zurückbleiben von Speiseresten besonders günstige Lebensbedingungen für diese exquisiten Liebhaber der Eiweißfäulnis geschaffen werden. Bei alten Tieren konnten dagegen Spirochäten immer gefunden werden. Auf den Tonsillen scheinen sie erheblich seltener zu sein, sogar noch seltener als in den Zahntaschen. Von den gefundenen Spirochäten ist die Spir. dentium am häufigsten beobachtet worden, dann die media, und schließlich die buccalis. Aus der folgenden Tabelle II (S. 352) resultieren die oben besprochenen Spirochätenbefunde.

Wenden wir uns jetzt den Untersuchungen auf Anaërobier zu, so darf betont werden, daß die Technik die gleiche war, wie sie oben dargelegt worden ist. Nach vielen vergeblichen Versuchen gelang es, bei einem $1^3/_4$ und einem 2 Jahre alten Tier im Molarenabstrich einen kleinen, obligat anaëroben Streptococcus festzustellen, der morphologisch und kulturell vielleicht als Abart des Streptococcus putridus aufgefaßt werden kann. Interessant war bei diesem Streptococcus, in Uebereinstimmung mit Massani (Ztschr. f. d. ges. exp. Med. Bd. 2. 1914), das Auftreten von gramnegativen Gliedern in einer sonst grampositiven Kette, und das Fehlen von Gas- und Gestankbildung. Ein Tierversuch, subkutane Impfung einer weißen Maus mit einer NaCl-Aufschwemmung des Stammes verlief negativ; leider ist es unterlassen worden, intraperitoneal ein Tier zu infizieren. Die weiteren Untersuchungsergebnisse ergeben nichts Neues. Die Betrachtung der direkten Ausstriche zeigte nichts Abweichendes von den weiter oben mitgeteilten Ergebnissen.

Zwei weiteren Untersuchern wurde nun die Aufgabe gestellt, den Keimgehalt in der Mundhöhle der Schweine festzustellen. Untersuchungen hierüber sind bereits am Menschen mehrfach angestellt worden, bei Tieren nicht. Vor allem ist aber der Keimgehalt des Zahnbelages nicht untersucht worden. Die Methode war diese: Von jedem Tiere wurde immer mit derselben Oese ein Abstrich von dem Belag

Tabelle II.

Nr. des Tieres	Alter in Monaten	Zahnzustand	Entnahmestelle	Spirochäten	Menge	Arten	Menge
1	6—8	?	Zahnbelag	?	—	—	—
2	7	keine Karies	Zahnabstrich	nein	—	—	—
3	7	dgl.	„	„	—	—	—
4	7	„	„	„	—	—	—
5	8	„	„	„	—	—	—
6	8	„	„	„	—	—	—
7	8	„	„	„	—	—	—
8	8	„	„	„	—	—	—
9	8	„	„	„	—	—	—
10	9	Karies einiger Zähne	kariöser Backenzahn	ja	j. G. 2—3	dentium media buccalis	reichlich nicht selten fraglich
11	9	keine Karies	Zahnabstrich	nein	—	—	—
12	9	dgl.	„	„	—	—	—
13	9	„	„	„	—	—	—
14	9	„	„	ja	j. G. 2—3	dentium media buccalis	häufig nicht selten spärlich
15	9	„	„	nein	—	—	—
16	9	„	„	„	—	—	—
17	12	„	Zahnbelag	ja	in3G.2—3	nur dentium	reichlich
18	15	wenig	1. Zahntasche 2. Tonsille	n.m.B. nein	— —	— —	— —
19	18	starke	kariöser Zahn	ja	j. G. 2—3	dentium media buccalis	reichlich nicht selten selten
20	18	wenig	1. Zahntasche 2. Tonsille	nein „	— —	— —	— —
21	18	„	1. Zahntasche 2. Tonsille	n.m.B. nein	— —	— —	— —
22	18—20	?	Zahnbelag	n.m.B.	—	—	—
23	18—20	Karies	1. Zahntasche 2. Tonsille	n.m.B. nein	— —	— —	— —
24	20	Karies	Zahntasche	ja	in 3 G. 1	nur dentium	—
25	21	starke Karies, Zahnstein	mittlere untere Incisivi	„	j. G. 4—5	dentium media buccalis	reichlich häufig nicht selten
26	21	etwas Karies	dgl.	„	j. G. 2—3	dentium media buccalis	reichlich häufig nicht selten
27	21	wenig Karies	„	„	j. G. 1	dentium media buccalis	häufig nicht selten fraglich
28	24	Karies. Zahnstein	„	„	j. G. 4—5	dentium media buccalis	reichlich weniger reichl. nicht selten

Erklärung der Abkürzung: Unter Kolonne „Spirochäten“ n. m. B. = nicht mit Bestimmtheit gefunden. „Menge“ j. G. = in jedem Gesichtsfeld.

der Schneidezähne gewonnen, wobei darauf geachtet wurde, daß die Oese immer gleichmäßig gefüllt war. Allerdings muß betont werden, daß diese Füllung nicht immer ausschließlich aus Zahnbelag bestand, sondern sicher wechselnde Mengen von Speichel enthielt. Da nun aber die Tiere 12 Std. vorher gehungert hatten, so war es wenigstens möglich, größere Beimengungen von Speiseresten zu vermeiden, um so eher,

als das ganze Gebiß des Tieres offen und leicht erreichbar vor dem Untersucher lag und dementsprechend eine gute Auswahl von Stellen getroffen werden konnte, wo makroskopisch jedenfalls keine Speisereste sichtbar waren. Sämtliche Tiere waren gerade mit dem Schlagbolzen getötet, aber noch nicht entblutet. Der Inhalt der Oese wurde in einem sterilen Röhrchen, in dem sich 1 ccm steriles Wasser befand, verrieben. Dann wurde mit einem Abstrich der Molaren ebenso verfahren. Nach Rückkehr vom Schlachthof ins Institut wurde sofort von dem infizierten Wasser eine (dieselbe) Oese voll in ein 10 ccm hoch mit 3proz. geschmolzenen Agar gefülltes Reagenzglas gebracht und eine Platte gegossen. Die Platten kamen dann nach dem Erstarren in den Brutschrank bei 37 ° und wurden nach 24, 48, 72 Std. herausgenommen. Die Untersuchungen hatten folgende Ergebnisse:

Nr. des Tieres	Alter des Schweines	Anzahl der Kolonien vom Schneidezahn-	Backenzahnabstrich	Summe
1	9 Monate	269	289	558
2	12 „	369	317	686
3	6 „	32	13	45
4	18 „	317	376	693
5	18 „	ca. 300	ca. 400	ca. 700
6	6 „	14	10	24
7	6 „	5	15	20
8	18 „	447	474	921
9	18 „	342	332	674
10	24 „	676	670	1 346
11	12 „	384	289	673
12	18 „	688	854	1 522
13 } lebend, aber	3 „	322	576	898
14 } 12 Std. ge-	3 „	461	814	1 275
15 } hungert	3 „	660	380	1040
		Sa. 5266	5809	11 075

Im Durchschnitt waren also auf jeder Platte 11075 : 30 Kolonien = 369 Kolonien, d. h. in einer Oese voll Wasser 369 Keime. Da nach Berechnung nun in 1 ccm Wasser 357 Oesen waren, eine Oese aber 369 Keime enthielt, so waren in 1 ccm infizierten Wassers 131 733 Keime enthalten. Das durchschnittliche Gewicht einer Oese voll Zahnbelag wurde auf 3,6 mg bestimmt, woraus resultiert, daß in 3,6 mg Zahnbelag im Durchschnitt 131 733 Keime enthalten waren. Hieraus läßt sich leicht berechnen, daß in 1 g Zahnbelag die ansehnliche Zahl von 36 592 500 Keimen vorhanden sind.

Bei der Durchsicht obiger Aufstellung fällt auf, daß die Abstriche von den 3 jüngsten getöteten Tieren (3, 6, 7) eine von dem Durchschnitt erheblich abweichende niedrige Keimzahl ergaben. Der Bakteriengehalt des Zahnbelages von Incisiven und Molaren stimmte bei den meisten Tieren annähernd überein. Eine Ausnahme machten die drei lebend untersuchten Schweine 13, 14 und 15. Die Differenz ist hier größer, was vielleicht darauf zurückgeführt werden kann, daß das Abstrichnehmen hier nicht mit derselben Ruhe und Sorgfalt vorgenommen werden konnte wie bei den getöteten. Aber selbst wenn man aus der obigen Aufstellung die Tiere 3, 6, 7, 13, 14 und 15 herausnimmt, würde sich das Resultat von 36 Millionen Keimen in 1 g Zahnbelag nur wenig ändern: ca. 32 Millionen in 1 g. Ganz allgemein muß

natürlich betont werden, daß es sich bei vorstehender Berechnung nur um eine vorsichtige Schätzung handeln kann, da eine Anzahl von Bakterien sich auf den gewöhnlichen Nährböden nicht züchten läßt oder aber nur anaërob gedeiht.

Eine weitere Reihe von Untersuchungen ist angestellt worden, um die Keimzahl in 1 g Speichel in Beziehung zum Zahnbelag zu bestimmen. Es wurden bei 20 Tieren Speichelabstriche gemacht und 4555 Kolonien gezählt. Der Durchschnitt betrug also 228 Kol., d. h. in 1 Oese infizierter Kochsalzlösung (statt Wasser) 228 Keime. In 1 ccm NaCl-Lösung waren 357 Oesen voll enthalten. In 357 Oesen wären dann 81396 Keime vorhanden gewesen, d. h. 1 g Speichel enthielt 32558400 Keime (1 Oese voll Speichel wog im Durchschnitt 2,5 mg). Zum Vergleich wurde nun auch der Keimgehalt des Zahnbelages von Molarenabstrichen bestimmt:

Nr. des Tieres	Alter des Tieres	Zahl der Kolonien vom	
		Speichel	Molarenabstrich
1	6 Monate	61	120
2	9 „	111	280
3	18 „	347	423
4	9 „	130	217
5	9 „	91	198
6	24 „	380	600
7	12 „	238	490
8	18 „	220	319
9	12 „	285	234
10	12 „	360	587
11	18 „	254	436
12	18 „	210	392
13	6 „	160	267
14	9 „	187	109
15	9 „	81	94
16	9 „	131	156
17	24 „	427	634
18	6 „	224	311
19	6 „	140	466
20	12 „	518	691
	Summe	4555	7033 Kolonien
	Durchschnitt	228	351 „
	und in 1 Oese voll infizierter NaCl-Lösung	228	351 Keime

Es geht aus dieser Aufstellung hervor, daß in 1 Oese Zahnbelag wesentlich mehr Keime enthalten sind als in 1 Oese Speichel, ca. 53 Proz. Verglichen mit dem oben besprochenen Resultat von 36,5 Millionen Keimen in 1 g Zahnbelag, stimmen diese Untersuchungen an 20 Schweinen sehr gut überein: es fanden sich bei ihnen in 1 g Speichel 32,6, in 1 g Zahnbelag 34,8 Millionen unter aëroben Bedingungen entwicklungsfähige Keime (bei Berechnung auf 1 g verwischt sich also der Unterschied der Keimzahl ziemlich!).

Unsere Resultate sind im Gegensatz zu Ergebnissen, die von anderer Seite beim Menschen erhoben worden sind, sehr abweichend. In der Literatur finden sich allerdings keine Angaben über den Keimgehalt vom Zahnbelag beim Menschen, wohl dagegen solche über die Mengen von Keimen im Speichel. Ewers (I.-D. Kiel 1920), Schwiegk (I.-D. Kiel 1920/21) und Fröhlich (I.-D. Kiel 1920/21) fanden im menschlichen Speichel je nach dem Zustande der Zähne 0,5—5 Millionen Keime.

Um die Zahl der Anaërobier festzustellen, ist folgendermaßen verfahren worden: Von demselben Ausgangsmaterial wurden gleiche Mengen in Gußplatten gebracht, von denen je eine unter aëroben, die andere unter anaëroben Bedingungen gehalten wurde. Die Zahl der Anaëroben bei 20 Tieren ist relativ gering. Es zeigt sich, daß in 1 g Speichel im Durchschnitt 32,5 Millionen unter aëroben Bedingungen wachsende, aber nur rund 992000 = 4,3 Proz. anaërobe Bakterien sich befinden. Von diesen 4,3 Proz. sind sicher viele noch fakultative Anaërobier (s. o.). Für den Zahnbelag sind die entsprechenden Zahlen:

34,8 Mill. obligate Aerobier
2,8 „ = 8 Proz. obligate Anaërobier oder Fakultative.

Ein kleiner Versuch zum Beweis, daß die in der Mundhöhle der Schweine befindlichen Keime zum weitaus größten Teil obligate Aërobier sind, sei hier angeführt:

Die Platten wurden zunächst 48 Std. anaërob und darauf 5 Tage aërob bei 37° bebrütet.

Nr.	Alter des Schweines	Zahl der Kolonien aus			
		Speichel 48 Std. anaërob	Zahnbelag von den Molaren. 48 Std. anaërob	Speichel 48 Std. anaërob, darauf 5 Tage aërob	Zahnbelag von den Molaren. 48 Std. anaërob, darauf 5 Tage aërob
1	9 Monate	2	9	308	415
2	12 „	6	22	441	637
3	18 „	5	29	757	826
	Summe	13	60	1506	1878
	Durchschnitt	4,3	20	503	626 Kolonien
	in 1 Oese voll infizierter NaCl-Lösung	4,3	20	503	626 Keime

Von denselben Schweinen wuchsen aus demselben Ausgangsmaterial unter aëroben Bedingungen aus Speichel schon nach 48 Std. 349, nach 5 Tagen 561 Kolonien, aus Zahnbelag nach 48 Std. schon 518, nach 5 Tagen 670 Kolonien. Die Endergebnisse nach 5 Tagen stimmen recht gut überein: 518 und 502, sowie 670 und 626.

Wir sehen also, daß in der Mundhöhle in der überwiegenden Zahl Luftsauerstoff liebende Bakterien angetroffen wurden, was ja bei der fortwährenden intensiven Durchlüftung dieser Körperhöhle eigentlich nicht verwunderlich ist. Umgekehrt ist es auch ohne weiteres zu verstehen, daß obligate Anaërobier unter diesen Verhältnissen nur verhältnismäßig selten daselbst anzutreffen sind. Nur da, wo Schädigungen der Schleimhaut und Gewebszerfall den Luftsauerstoff fortwährend absorbieren, oder wo auf geschädigter Schleimhaut sich Luftsauerstoff liebende Mikroorganismen ansiedeln, wird durch die Absorption des Sauerstoffes durch diese zugrundegehenden Gewebsteile oder durch die Bakterien ein sehr geeigneter Nährboden für obligate Anaërobier geschaffen (Plaut-Vincentsche Angina, Noma, Kiefernekrose u. a.). Aehnlich werden die Verhältnisse in kariösen und an gesunden Zähnen liegen, denen sehr viele Speisereste, Kohlehydrate, aber auch Eiweißstoffe anhaften.

Wenn wir bei den Pflanzenfressern bei normaler Ernährung und besonders bei Hartfütterung einen ausgesprochen niedrigen Keimgehalt feststellen konnten, wenn wir sehen, daß bei Weichfütterung dieser Tiere der Reichtum an Mikroorganismen auf das 10fache stieg, wenn

23*

bei mit Grünfutter und Heu gefütterten Ziegen der Keimreichtum schätzungsweise dem der Meerschweinchen entspricht, so kann uns der enorme Reichtum beim Schweine unter Berücksichtigung seiner üblichen Nahrung nicht wundern. Wenn wir dann ferner sehen, daß der Mensch auch bei stark kariösen Zähnen nur etwa den 6. Teil der Keime im Speichel aufweist wie ein Schwein, trotzdem die Bezahnung und die Zusammensetzung der Kost doch bei beiden große Aehnlichkeiten aufweist, so ist man gezwungen, diese relative Keimarmut in der Mundhöhle des Menschen, die etwa der der mittelweich gefütterten Pflanzenfresser entspricht, auf die natürliche und künstliche Reinigung der Mundhöhle des Menschen zu beziehen. Für die natürliche dürfte wohl in erster Linie die Konsistenz der üblichen menschlichen Nahrungsmittel, besonders des Brotes, in Frage kommen.

Literatur.

1) Heilbrunn, Diss. Kiel. 1920. — 2) Reiche, Diss. Kiel. 1921. — 3) Hähne, Diss. Kiel. 1921. — 4) Gerdes, Diss. Kiel. 1921. — 5) Leiffermann, Diss. Kiel. 1921. — 6) Leiser, Diss. Kiel. 1921. — 7) Bender, Diss. Kiel. 1921. — 7) Piepgras, Diss. Kiel. 1922. — 9) Leesemann, Diss. Kiel. 1922. — 10) Rehder, Diss. Kiel. 1922. — 11) Kühl, Diss. Kiel. 1922.

Ueber Trypanosomen.

I. Mitteilung: Das Phänomen der Trypanosomenwiederbelebung und das Vorhandensein vergärbarer Substanzen in den Lebern und deren Extrakten, welche „wiederbelebend“ wirken.

[Aus dem Bakteriol. Institut der Tierärztl. Hochschule zu Montevideo (Direktor: Prof. Dr. Kurt Schern).]

Von Prof. Dr. **Kurt Schern.**

Ueber die eigenartige Wirkung von Serum- und Leberextrakten auf Trypanosomen habe ich seinerzeit berichtet (Arbeit. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. 38. Heft 3), als ich noch im Uhlenhuthschen Laboratorium arbeitete. Es sind damals von mir Stoffe im Serum und in der Leber gefunden worden, welche bis dahin hinsichtlich ihrer Wirkung auf Trypanosomen nicht bekannt waren. Bei der von mir gemachten Feststellung handelt es sich, wie sich später herausstellte, um ein allgemeines, für die Trypanosomen gültiges Gesetz.

Die Basis für diese Arbeit gab die von mir gemachte Beobachtung, daß soeben unbeweglich gewordene Trypanosomen (Nagana, Dourine, Schlafkrankheit des Menschen) nach Zusatz von Blut einer gesunden Ratte oder von Pferdeserum wieder beweglich wurden. Trägt man z. B. auf ein Deckgläschen trypanosomenhaltiges Blut auf und beobachtet mit Hilfe des Mikroskopes die Beweglichkeit der Trypanosomen, so kann man nach einiger Zeit feststellen, daß die Parasiten unbeweglich bzw. sehr wenig beweglich geworden sind. Gibt man in diesem Augenblick mit einer sterilen Platinöse etwas frisches Serum eines gesunden Pferdes, Menschen, Affen, Huhnes, Kaninchens, Meerschweinchens usw. zu dem Blut hinzu, so sieht man sehr bald bei der nachfolgenden, mikroskopischen Untersuchung die Trypanosomen ihre ursprüngliche Beweglichkeit wieder erlangen. Gewöhnlich sind diese

Versuche von mir im Reagenzglas angestellt worden. Neuerdings hat Vogelsang das Phänomen auch bei Mal de Caderas-Trypanosomen festgestellt. Es ergab sich aus diesen Beobachtungen die Aufgabe, das Phänomen der Wiederbelebung bzw. Lebensverlängerung der Trypanosomen weiterhin aufzuklären, wobei sich zunächst herausstellte, daß das Phänomen besonders gut mit solchen Trypanosomen gelingt, deren Lebensfähigkeit als „labil" bekannt ist. Denn außerhalb des infizierten Organismus sind die Trypanosomen verschieden lange beweglich. Einmal trifft man, wenn man z. B. infizierte Ratten untersucht, Trypanosomen an, welche außerhalb des Organismus noch mehrere Stunden gut beweglich sind, ein anderes Mal kann man feststellen, daß die zur Untersuchung gelangenden Trypanosomen nur sehr kurze Zeit, z. B. während 10—15 Min., ihre Beweglichkeit bewahren und danach unbeweglich werden. Wie meine Beobachtungen gezeigt haben, hängt das von mir beobachtete Verhalten hinsichtlich der festgestellten Beweglichkeit der Trypanosomen hauptsächlich davon ab, während welchen Stadiums einer Infektion die Trypanosomen zur mikroskopischen Betrachtung herangezogen werden. Zum Beispiel sind die Trypanosomen einer frisch infizierten Ratte (1. Stadium einer Infektion) meist mehrere Stunden im mikroskopischen Präparat beweglich. Dagegen sind Trypanosomen, welche aus einem schon längere Zeit infizierten Tiere stammen, viel labiler (2. Stadium der Infektion), während die Parasiten, welche aus einer infizierten Ratte herrühren, die vor dem Exitus an Trypanosomiasis steht, meist in wenigen Minuten ihre Bewegungen einstellen (3. Stadium oder Endstadium der Infektion). Die von mir bisher beschriebenen Versuche und auch die, welche sich in den nachfolgenden Mitteilungen mit dieser Materie befassen, sind fast ausschließlich mit den sehr labilen Trypanosomen des 3. Stadiums oder Endstadiums einer Infektion angestellt worden. Es ist wichtig, diesen Punkt zu berücksichtigen, auch deshalb, weil durch die Festlegung des Begriffes von der Labilität der Trypanosomen alle die unsicheren Vorstellungen, z. B. von der „auf der Höhe der Infektion stehenden Ratte", verschwinden. Auf diese Weise kann man jetzt jederzeit feststellen, welche Motilitätseigenschaften jeweils in derartigen Versuchen verwendete Trypanosomen besitzen. Nach neueren Beobachtungen von mir erhält man über die Trypanosomenlabilität noch bessere Aufschlüsse, wenn man die aus dem Schwanz entnommenen Trypanosomen mit etwas Natriumzitratlösung vermischt und dann beobachtet. Werden die Trypanosomen in kürzester Zeit unbeweglich, so sind sie äußerst labil.

Nebenbei sei bemerkt, daß mit Hilfe der geschilderten Kenntnis auch gewisse prognostische Schlüsse hinsichtlich des Ablaufes der Trypanosomeninfektion bei der Ratte in bestimmten Grenzen gestattet sind, wenn man z. B. den Zeitpunkt der Infektion des Tieres nicht kennt. Sind die einem infizierten Rattenorganismus entnommenen Trypanosomen außerhalb dieses noch längere Zeit beweglich, so lebt der Parasitenträger noch längere Zeit, sind aber die Trypanosomen bereits sehr labil und in ca. 10 Min. unbeweglich, so ist gewöhnlich in kurzer Zeit, meist in wenigen Stunden, mit dem Tode des Tieres zu rechnen.

Diese Tatsachen zu erkennen, ist bedeutungsvoll, wenn man Versuche über das von mir beschriebene Phänomen anstellen will, weil man für diese stets die geeigneten Trypanosomen verwenden muß.

Hatte sich mir bis dahin stets das Serum als ein Träger der lebensverlängernden bzw. wiederbelebenden Eigenschaften gezeigt, so

war zu prüfen, ob das Serum als einziger Stoff des Körpers die erwähnten Eigenschaften besaß, oder ob andere Organe ebenso ausgestattet waren, und ob von diesen das Serum mit den fraglichen Stoffen gespeist wurde. Zum Zwecke der Beantwortung dieser Frage stellte ich mir Organverreibungen her und ließ diese auf hochgradig labile Trypanosomen im Reagenzglas wirken. Hierbei wurde von mir festgestellt, daß nur noch der Leberbrei lebensverlängernd und wiederbelebend auf die Parasiten wirkte. Mithin konnte gefolgert werden, daß Serum und Leber mit Rücksicht auf das von mir beobachtete Trypanosomenphänomen eine elektive Stellung gegenüber den anderen Bestandteilen des Organismus einnehmen.

Weiterhin wurde von mir festgestellt, daß die fraglichen Stoffe koktostabil, gegen Eintrocknen widerstandsfähig, daß sie im Eisschrank und bei 37° längere Zeit haltbar sind. Durch Fäulnis wird ihre Wirkung unterdrückt. Auch bekannte und im Handel käufliche Leberstoffe habe ich auf labile Trypanosomen einwirken lassen, ohne aber aus diesen Versuchen dahingehende Schlüsse ziehen zu können, daß eine dieser Lebersubstanzen mit Sicherheit das von mir beobachtete Phänomen ebenso auslöst, wie das Serum oder die Leber selbst.

Dagegen ist es mir gelungen, durch geeignete Eingriffe, deren Technik ich schon früher beschrieben habe (l. c.), aus der Leber und dem Serum eine Masse zu gewinnen, welche in konzentrierter Form die das Trypanosomenphänomen auslösenden Stoffe enthält. Diese Masse (Leberextrakt) ist jahrelang im Laboratorium aufbewahrt worden, ohne daß sie etwas von ihrer lebensverlängernden bzw. wiederbelebenden Kraft eingebüßt hat.

Bis dahin hatte ich stets Serum und Leber normaler Tiere auf Trypanosomen zum Zwecke dieser Versuche einwirken lassen. Es schien mir für die Erkenntnis der pathogenen Wirkung der Trypanosomen im Organismus von Bedeutung zu sein, auch festzustellen, ob Serum und Leber der an einer Trypanosomiasis leidenden Tiere ebenso wirkte wie die der normalen Tiere. Meine in dieser Richtung angestellten Versuche haben ergeben, daß die lebensverlängernden Stoffe während einer Trypanosomeninfektion allmählich mit dem Fortschreiten des Krankheitsprozesses abnehmen. Am Ende der Infektion sind sie nicht nachweisbar; sie fehlen demnach im Serum von Ratten, welche sich im 3. oder im Endstadium der Infektion befinden. Auch die frische Leber einer an Trypanosomiasis verendeten Ratte besitzt die Stoffe nicht mehr in derselben Menge wie eine normale Rattenleber.

Ich konnte infolgedessen sagen, daß uns ein ganz neuartiger Einblick in die Pathogenese der Trypanosomeninfektion durch meine Arbeiten gewährt worden ist. Wußte man bis dahin überhaupt gar nichts Sicheres über die pathogene Wirkung der Trypanosomen im Organismus, so hatten jetzt die Ergebnisse meiner Forschungen gezeigt, daß während einer Trypanosomeninfektion ein bestimmter Stoff aus Serum und Leber verschwindet.

Interessant war dabei, daß die Arsenbehandlung infizierter Ratten die bereits verschwundenen, das von mir gefundene Phänomen bedingenden Stoffe wieder — entsprechend dem Fortschreiten der Heilung der Krankheit und dem Verschwinden der Trypanosomen aus der Blutbahn — in Erscheinung treten läßt.

Bei einer Dauerheilung behält auch das Serum dauernd seine wiedergewonnenen „lebensverlängernden" Stoffe. Tritt aber bei dem mit

Arsen behandelten Tier ein Rezidiv auf und werden die Trypanosomen im Verlauf der weiteren Behandlung mit Arsen „arsenfest“, so schwinden auch die lebensverlängernden Stoffe wieder entsprechend dem Fortschreiten der Vermehrung der Trypanosomen.

Auch diese Tatsachen erweiterten unsere Kenntnisse von der pathogenen Wirkung der Trypanosomen im Organismus und wiesen darauf hin, daß während einer Trypanosomeninfektion vermutlich eine schwere Schädigung des Lebergewebes stattfindet. Welcher Art diese Schädigung sein könnte, ließ sich nicht ohne weiteres sagen. Nach verschiedenen Richtungen hin zur Klärung dieser Frage angestellte Versuche wiesen auf eine Störung im Leberhaushalte nach Kohlehydratbelastung hin[1]). Bei vermehrtem, künstlich bewirktem Kohlehydratangebot an die Leber stellte sich heraus, daß Ratten im 1. und 2. Stadium der Infektion die einverleibten Kohlehydratmengen im Organismus festhalten. Dagegen scheiden die im Endstadium einer Trypanosomeninfektion (Stadium 3) befindlichen Ratten das verabreichte Kohlehydrat mit dem Urin aus. Dadurch war eine funktionelle Leberstörung bei der Trypanosomiasis nachgewiesen.

Es ergab sich daraus, festzustellen, ob sich durch geeignete Versuchsanordnung etwas über die weiteren Eigenschaften der „lebensverlängernden“ Stoffe in Erfahrung bringen ließ. Die Untersuchung des Leberextraktes daraufhin, ob etwa Lipoide die Ursache wären für die eigenartigen „lebensverlängernden“ Wirkungen, lieferte ein nicht befriedigendes Resultat, und ich habe heute die Ueberzeugung gewonnen, daß es fraglich ist, ob die Lipoide die Grundlage für das von mir beschriebene Trypanosomenphänomen abgeben.

Deshalb habe ich den Leberextrakt erneut auf die Gegenwart bestimmter Kohlehydrate geprüft.

In der von mir bekannt gegebenen Weise wird zunächst aus normaler Rinderleber ein Extrakt, und von diesem in destilliertem Wasser eine 10proz. Lösung hergestellt. (Es sei hervorgehoben, daß eine Lösung mit Aqua destill., nicht mit physiol. Kochsalzlösung, verwendet worden ist.) Die Lösung wird aufgekocht, danach abgekühlt, dann in ein Gärröhrchen gefüllt und etwas Hefe hinzugefügt.

Zur Kontrolle wird ein gleichartiges Gärröhrchen mit abgekochter, 1proz. Traubenzuckerlösung (destill. Wasser) und hiernach mit etwas Hefe beschickt. Eine weitere Kontrolle besteht aus abgekochtem, danach abgekühltem destill. Wasser mit etwas Hefe in einem Gärröhrchen. Diese 3 Gärröhrchen werden bei 37° gestellt.

Schon nach 1 Std. Aufenthalt der Gärröhrchen im Brutschrank ist eine bedeutende Vergärung des Leberextraktes festzustellen, in ihm hat sich sogar etwas mehr Gas gebildet als in der Zuckerlösung, während sich in dem Kontrollröhrchen, welches nur destill. Wasser mit Hefe enthält, kein Gas gebildet hat. Auch nach 22stünd. Aufenthalt bei 37° ist im Leberextrakt doppelt so viel Gas gebildet als in der Traubenzuckerlösung.

Die eine Kontrolle dieses Versuches zeigt an, daß die Hefesubstanz keine vergärungsfähigen Körper enthalten hat. Außerdem hat die Hefe in der Zuckerkontrolle den Zucker stark vergoren, woraus auf ihre Wirksamkeit zu schließen ist. Das Röhrchen mit dem Leberextrakt beweist, daß dieser eine große Menge Substanzen enthält, welche von der Hefe vergoren werden.

1) Schern, Ueber das Verhalten neuer Serum- und Lebersäfte, sowie über Lävulosurie bei der Trypanosomiasis. (Berl. tierärztl. Woch. 1913. Nr. 40.)

Dieser Versuch ist öfter wiederholt worden, und dabei stets das gleiche Resultat erzielt worden. Da in den 10proz. Leberextraktlösungen die Vergärung stets sehr stürmisch und kräftig erfolgte, so habe ich später fast immer mit 5proz. Extraktlösungen gearbeitet.

Aber diese Gärversuche sind nicht nur mit Rinderleberextrakt, sondern auch mit Leberextrakten von normalen Hühnern, Kaninchen, Meerschweinchen, Ratten usw. angestellt worden. In allen diesen Fällen sind immer dieselben Resultate erzielt worden: Mehr oder weniger starke Vergärung der Leberextrakte durch die Hefe.

Durch Vergleich mit Zuckerlösungen bekannter Konzentration lassen sich auch die in den Extrakten vorhandenen, vergärungsfähigen Substanzen ihrer Menge nach berechnen. Die dabei angewendete Formel ist folgende: Will man die erhaltenen Zuckerwerte vergleichsweise nach Prozenten mit der im Kontrollversuch benutzten Zuckerlösung berechnen, dann setzt man den unbekannten Zuckerwert zunächst als x und bringt die Gärungszahlen zueinander in ein Verhältnis. Die gewonnenen Zahlen verhalten sich zueinander, wie der Gehalt des Extraktes an Zucker zu dem Gehalt von 1 Proz., also z. B.: Ein 5proz. Rinderleberextrakt hat 5 Teilstriche vergoren, die Zuckerlösung hat 7,75 vergoren, so lautet der Ansatz 5:7,75—x: 1, somit x = 0,6 Proz.

Es sei erwähnt, daß auch Serum und die Lebern verschiedener Tiere dem Einfluß der Hefe ausgesetzt worden sind. Aber die Gasbildung setzt bei dieser Versuchsanordnung erst bedeutend später, manchmal gar nicht ein, und es ist dann aus verschiedenen Gründen nicht immer leicht, sie zu beurteilen, weshalb vorläufig die Versuche nach dieser Richtung nicht weiter verfolgt worden sind.

Aus der allgemeinen Biologie ist bekannt, daß die Hefe ein Ferment enthält, welches Zucker vergärt. Es ist deshalb anzunehmen, daß die Gasbildung im Leberextrakt eine Zuckervergärung darstellt.

Aus diesen Versuchen folgt, daß von Extrakten, die aus Lebern normaler Tiere hergestellt worden sind, und welche auf Grund früherer Versuchsresultate das von mir beschriebene Trypanosomenphänomen bedingen, bestimmte Substanzen enthalten, welche von Hefe stark vergoren werden.

Ob die vergorenen Leberextrakte das von mir beschriebene Trypanosomenphänomen auslösen, wird Gegenstand einer weiteren Mitteilung sein.

Ueber Trypanosomen.

II. Mitteilung: Sind in den Extrakten, welche aus den Lebern der an einer akuten Trypanosomiasis verendeten Tiere hergestellt sind, noch durch Hefe vergärbare Substanzen vorhanden?

[Aus dem Bakteriol. Institut der Tierärztl. Hochschule zu Montevideo (Direktor: Prof. Dr. Kurt Schern).]

Von Prof. Dr. **Kurt Schern.**

Nachdem ich festgestellt habe, daß die Leberextrakte normaler Tiere vergärungsfähige Substanzen, wahrscheinlich Zucker, enthalten,

war es von Bedeutung, zu erfahren, ob auch die Extrakte der Lebern, welche von den an einer Trypanosomiasis verendeten Tieren stammen, derartige, durch Hefe zerlegbare Körper aufweisen.

Der 1. Versuch nach dieser Richtung ist von mir mit der Leber einer an Mal de Caderas verendeten Ratte angestellt worden. Aus der Leber wurde in bekannter Weise ein Extrakt hergestellt. Die Extraktausbeute war sehr gering. Von dem Extrakt stellte ich mir mit destill. Wasser eine 5proz. Lösung her, die aufgekocht, abgekühlt und der etwas Hefe zugegeben wurde. Die Flüssigkeit wird in ein schmales Gärröhrchen gefüllt und in den Brutschrank bei 37° gestellt. Zur Kontrolle wird in gleicher Weise ein Extrakt aus einigen normalen Rattenlebern angesetzt und auch bei 37° gehalten. Dieser normale, 5proz. Rattenleberextrakt zeigt schon nach $2^1/_2$ Std. eine starke Gasbildung (3 ccm). In dem Extrakt, welcher aus der Leber der an Mal de Caderas verendeten Ratte bereitet ist, läßt sich Gasbildung nicht nachweisen.

Daraufhin sind während mehrerer Wochen allen Meerschweinchen, welche im Verlaufe der experimentellen Trypanosomenarbeiten der Mal de Caderas-Infektion erlagen, die Lebern entnommen, im Mörser verrieben und dann in der üblichen Weise alle zusammen zum Extrakt verarbeitet worden. Von dem Extrakt aller dieser Meerschweinchenn wird eine 5proz. Lösung mit destill. Wasser hergestellt und danach der Gärversuch mit Hefe unter Beobachtung der Kontrollen genau wie in den bisherigen Versuchen vorgenommen.

In der Zuckerkontrolle haben sich nach 7stünd. Aufenthalt bei 37° 6 ccm Gas gebildet. Dagegen ist in dem Röhrchen, welches den Leberextrakt der der Trypanosomiasis erlegenen Meerschweinchen enthält, nicht eine Spur von Gas gebildet worden.

Die Befunde gaben Veranlassung, auch die Leber eines an Mal de Caderas verendeten Pferdes in demselben Sinne zu untersuchen. Das Pferd war 34 Tage nach erfolgter Infektion plötzlich verendet. Es hatte zu Lebzeiten in seinem Serum reichlich Agglutinine für Trypanosomen: In dem während eines Fieberanfalles entnommenen Serum ließen sich im ungefärbten Blutpräparat leicht reichlich sehr lebhaft bewegliche Trypanosomen nachweisen. (Ueber den Gehalt des Serums an lebensverlängernden Stoffen zu Lebzeiten wird weiter unten berichtet.) Bei der Obduktion des Tieres, welche von Herrn Prof. Dr. Vogelsang ausgeführt wurde, stellte sich heraus, daß das Parenchym der Leber hochgradig fettig degeneriert war. Die fettige Degeneration hatte zur Ruptur der Leber und zu einer Verblutung in die Bauchhöhle geführt. Ein großes Stück dieser, infolge der Degeneration fast bröckligen Leber wird zu Extrakt verarbeitet und dieser Extrakt in 5proz. Lösung (dest. Wasser) mit den üblichen Kontrollen der Hefevergärung ausgesetzt. Während die Kontrollen die Richtigkeit der Versuchsbedingungen anzeigten, konnte festgestellt werden, daß sich nach 7stünd. Versuchsdauer bei 37° in dem Röhrchen, welches den Leberextrakt des an Mal de Caderas verendeten Pferdes enthielt, auch nicht eine Spur Gas in der Kuppe gebildet hatte.

Ebenso sind die Lebern von Kaninchen, welche einer Mal de Caderas-Infektion erlegen sind, auch die von Ratten und Mäusen, gesammelt und, jede Lebergruppe für sich, zu Extrakten verarbeitet

worden. Alle diese Extrakte sind im Hefegärversuch unter Innehaltung der von mir bisher geübten Methodik auf gärungsfähige Substanzen geprüft worden. Das Resultat aller dieser vielfachen und wiederholten Versuche ist stets das gleiche gewesen: Im Leberextrakt der der Trypanosomiasis erlegenen Tiere lassen sich durch Hefe vergärungsfähige Substanzen nicht nachweisen.

Es war interessant, festzustellen, wie sich in dieser Beziehung die Extrakte der Lebern solcher Tiere verhalten, welche im allgemeinen für eine Trypanosomeninfektion nicht empfänglich sind. Ich habe zur Klärung dieser Frage Hühner mit einer großen Dosis Mal de Caderas-Trypanosomen infiziert. Die Tiere bleiben dauernd ohne irgendwelche besonderen Symptome. Sie wurden nach Verlauf von 4 und mehr Wochen entblutet und ihre Lebern zu Extrakten verarbeitet, deren 5proz. Lösungen dann weiterhin im Hefegärversuch bei 37° geprüft wurden. Dieser Hühnerleberextrakt ist in allen Fällen in gleicher Weise wie Extrakt von normalen Hühnern vergoren worden.

Aus allen diesen Versuchen folgt, daß in den Extrakten von Lebern solcher Tiere, welche einer Trypanosomiasis erlegen sind, die in den Leberextrakten normaler Tiere vorhandenen, durch Hefe vergärungsfähige Stoffe, also hauptsächlich Zuckersubstanzen, fehlen.

Mithin ist anzunehmen, daß während einer Trypanosomeninfektion der für den Organismus lebenswichtige Zucker der Leber infolge der Infektion völlig verschwindet. Ob hier auch noch andere Stoffe eine Bedeutung haben, bleibt dahingestellt. Welche weitere Folge das hat, wird in den allgemeinen Schlußfolgerungen aller dieser Mitteilungen gesagt werden.

Bemerkenswert ist, daß die Extrakte, hergestellt aus Lebern von für eine Trypanosomiasis unempfindlichen Tieren, durch Hefe ebenso vergoren werden, wie die Extrakte normaler, gleichartiger Tiere. Bei diesen für die Trypanosomeninfektion unempfänglichen Tieren bleibt mithin die vergärungsfähige Substanz des Leberextraktes erhalten.

Ueber Trypanosomen.

III. Mitteilung: In welcher Weise wirken die vermittels Hefe vergorenen Extrakte der Lebern normaler Tiere in bezug auf das von mir beschriebene Trypanosomenphänomen?

[Aus dem Bakt. Institut der Tierärztl. Hochschule zu Montevideo (Direktor: Prof. Dr. K. Schern).]

Von Prof. Dr. **Kurt Schern.**

In Fortsetzung der bisher von mir angestellten Versuche war festzustellen, in welcher Weise die durch Hefe vergorenen Extrakte der Lebern normaler Tiere auf labile Trypanosomen wirken, und ob sie diese im Sinne der Lebensverlängerung bzw. Wiederbelebung beeinflussen.

In den nach dieser Richtung hin angestellten Versuchen sind Extrakte aus Rinder-, Kaninchen-, Hühner- und Meerschwein-

chenlebern in der Weise verwendet worden, daß zunächst von ihnen 5proz. Lösungen mit Aqu. destill. hergestellt, diese aufgekocht, darnach abgekühlt, dann mit etwas Hefe versetzt und bei 37° der Einwirkung des Hefefermentes ausgesetzt wurden. Nach abgelaufener Vergärung wurde die Flüssigkeit durch Papierfilter filtriert und einige Zeit ruhig stehen gelassen, bis sich ein Bodensatz gebildet und die darüber stehende Flüssigkeit geklärt hatte. Diese wurde abgegossen, nochmals aufgekocht, abgekühlt und zum 2. Male der Einwirkung der Hefe ausgesetzt. Mit dieser 2maligen Vergärung sollten nach Möglichkeit alle vergärbaren Substanzen, also der Zucker, aus dem Extrakt entfernt werden. Gewöhnlich ist bei der 2. Vergärung niemals Gas gebildet worden. Auch nach der 2. Gärung sind die Flüssigkeiten kurz aufgekocht und dann mit Hilfe der Filtration durch Papier und durch Absetzenlassen soweit wie möglich geklärt worden. Diese Extrakte werden in den weiteren Ausführungen usw. kurzweg als „vergorene Extrakte“, und die Extrakte, welche aus Lebern normaler Tiere stammen, als „normale Leberextrakte“ bezeichnet. Von den vergorenen Extrakten wurden in den ersten Versuchen dieser Art weiterhin Verdünnungen in der Weise hergestellt, daß je $^1/_2$ ccm Extrakt mit $4^1/_2$ ccm steriler physiol. Kochsalzlösung vermischt worden ist. Bei späteren Versuchen ist in etwas anderer Art verfahren worden, und zwar wurde direkt zu den vergorenen 5proz. Extraktlösungen so viel

	Angesetzt 8^{15} Uhr abds	8^{40} Uhr abds.	10 Uhr abds.	10^{15} abds.	10^{35} Uhr abds.	11 Uhr abds.		Am nächst. Tage früh 10 Uhr
$^1/_2$ ccm normaler Kaninchenleberextrakt + $^1/_2$ ccm Trypanosomenaufschwemmung labil in Natriumzitrat	Trypanosomen leben	sehr lebhaft beweglich	lebhaft bewegl.	lebhaft bewegl.	beweglich	beweglich	An diesem Abend der Versuch um 11 Uhr abgebrochen	die meisten Trypanosomen sind unbeweglich. Einige bewegen d. Geiß. schwach auf der Stelle.
$^1/_2$ ccm vergorener Kaninchenleberextrakt + $^1/_2$ ccm Trypanosomenaufschwemmung labil in Natriumzitrat	dgl.	fast alle Trypanosomen sind unbewegl. Einige schlagen mit der Geißel auf der Stelle.	unbeweglich	—	—	—		—
$^1/_2$ ccm normaler Meerschweinchenleberextrakt + $^1/_2$ ccm Trypanosomenaufschwemmung labil in Natriumzitrat	„	sehr lebhaft beweglich	lebhaft bewegl.	lebhaft bewegl.	bewegl. Einige schwach bewegl.	bewegl. Einige schwach bewegl.		unbeweglich
$^1/_2$ ccm vergorener Meerschweinchenleberextrakt + $^1/_2$ ccm Trypanosomenaufschwemmung labil in Natriumzitrat	„	fast alle Trypanosomen sind unbewegl. Einige schlagen mit der Geißel auf der Stelle.	unbeweglich	—	—	—		—
$^1/_2$ ccm 0,85proz. NaCl-Lösung + $^1/_2$ ccm Trypanosomenaufschwemmung labil in Natriumzitrat (Kontrolle)	„	unbeweglich	—	—	—	—		—
$^1/_2$ ccm Trypanosomenaufschwemmung labil in Natriumzitrat (Kontrolle)	„	unbeweglich	—	—	—	—		—

NaCl zugesetzt, daß der NaCl-Gehalt dem einer entsprechenden Menge 0,85proz. NaCl-Lösung entsprach. Diese salzhaltigen, vergorenen Extrakte wurden 20 Min. im Wasserbad gekocht und darnach je $^1/_2$ ccm Extrakt mit je $2^1/_2$ ccm steril. 0,85proz. NaCl-Lösung verdünnt. Diese Flüssigkeiten, welche Extrakte vor und nach der Vergärung sind, wurden hinsichtlich ihrer Wirkung auf labile Trypanosomen in der in der nachfolgenden Tabelle ersichtlichen — im Reagenzglas bei Zimmertemperatur — bekannten Weise geprüft.

Ergänzend ist zu der vorstehenden Tabelle zu bemerken, daß die Flüssigkeit in den Röhrchen, in welcher die Trypanosomen längere Zeit am Leben bleiben, durch die dunkelrote Farbe auffällt, während die anderen Röhrchen hellrote Flüssigkeit enthalten. Diese Beobachtung erklärt sich wahrscheinlich aus der Atmung der Trypanosomen.

Der Ausfall dieses Versuches zeigt deutlich, daß ein großer Unterschied zwischen dem normalen und vergorenen Leberextrakt besteht. Bereits nach 25 Min. langer Versuchsdauer macht sich dieser Unterschied bezüglich der Wirkung der Leberextrakte auf die Trypanosomen bemerkbar. Nach dieser Zeit sind die Parasiten in dem vergorenen Meerschweinchen- und Kaninchenleberextrakt fast alle unbeweglich, nur einige Trypanosomen bewegen noch ihre Geißeln auf der Stelle, während die Trypanosomen in den normalen, nicht vergorenen Leberextrakten von ihrer ursprünglichen, lebhaften Beweglichkeit nichts eingebüßt haben. Nach einer Versuchsdauer von 1 Std. und 20 Min. tritt der Unterschied noch viel deutlicher in Erscheinung, da die Trypanosomen in den vergorenen Extrakten zu dieser Zeit bereits völlig unbeweglich geworden sind, während sie in den normalen Extrakten weit über diese Zeit hinaus noch sehr lebhaft beweglich sind, wobei besonders bemerkenswert ist, daß die Trypanosomen im normalen Kaninchenleberextrakt sogar noch 12 Std. nach dem Zeitpunkt, in welchem sie im vergorenen Extrakt unbeweglich geworden sind, geringe Zeichen von Bewegungen erkennen lassen. — In der NaCl-Kontrolle (15) und in der Kontrolle ohne jeglichen Zusatz (6) sind die Trypanosomen schon nach 25 Min. unbeweglich geworden.

Es folgt aus diesem Versuche, daß die normalen Leberextrakte vor der Vergärung die Stoffe enthalten, welche das Trypanosomenphänomen auslösen, und daß den vergorenen Extrakten der gleichen Provenienz die Eigenschaft fehlt, in gleich starker Weise lebensverlängernd auf Trypanosomen zu wirken.

Es soll noch ein mit normalem Hühner- und Rinderleberextrakt, sowie mit denselben, aber vergorenen Extrakten angestellter Versuch in der nachfolgenden Tabelle (S. 365) hier angeführt werden.

Auch dieser Versuch mit dem Huhn- und Rinderleberextrakt, unvergoren und vergoren, hat das gleiche Resultat wie der frühere Versuch gezeitigt. Auch haben andere gleichartige Versuche stets das gleiche Ergebnis gehabt.

Mithin läßt sich aus diesen Experimenten ganz allgemein folgern, daß die vermittels der Hefe vergorenen Leberextrakte, hergestellt aus Lebern normaler Tiere, nicht annähernd in demselben Maße die lebensverlängernden Stoffe aufweisen, wie die gleichen Extrakte, wenn sie nicht vergoren sind. Durch die Vergärung wird der allergrößte Teil der lebensverlängernden Stoffe aus den

	Angesetzt 8^{45} Uhr abds.	9^{30} Uhr abends	10^{00} Uhr abends	10^{35} Uhr abends	11^{00} Uhr abends		Am nächst. Tage früh 9^{10} Uhr
) 1/2 ccm normal. Hühnerleberextrakt + 1/2 ccm Trypanosomenaufschwemmung von Ratte (Natriumzitrat)	Trypanosomen leben	sehr lebhaft beweglich	sehr lebhaft beweglich	sehr lebhaft beweglich	lebhaft beweglich	An diesem Abend den Versuch um 10 Uhr abgebrochen	unbeweglich
) 1/2 ccm vergorener Hühnerleberextrakt + 1/2 ccm Trypanosomenaufschwemmung von Ratte (Natriumzitrat)	dgl.	fast alle Trypanosomen sind unbewegl., einzeln. schlagen mit d. Geißel auf der Stelle	unbeweglich	—	—		—
) 1/2 ccm normal. Rinderleberextrakt + 1/2 ccm Trypanosomenaufschwemmung von Ratte (Natriumzitrat)	„	sehr lebhaft beweglich	sehr lebhaft beweglich	sehr lebhaft beweglich	sehr lebhaft beweglich		die meisten Trypanosomen unbewegl., einzeln. zuckend u. mit der Geißel auf der Stelle schlagend
) 1/2 ccm vergoren. Rinderleberextrakt + 1/2 ccm Trypanosomenaufschwemmung von Ratte (Natriumzitrat)	„	schwach beweglich auf der Stelle	unbeweglich	—	—		—
) 1/2 ccm 0,85proz. NaCl-Lösung (Kontrolle) + 1/2 ccm Trypanosomenaufschwemmung von Ratte (Natriumzitrat)	„	unbeweglich	—	—	—		—
) 1/2 ccm Trypanosomenaufschwemmung von Ratte (Natriumzitrat) (Kontrolle)	„	die meisten Trypanosomen unbeweglich. Einzelne schlagen schwach mit der Geißel auf der Stelle.	unbeweglich	—	—		—

Leberextrakten entfernt, und die Vergärung der Extrakte hat zur Folge, daß sie den Trypanosomen gegenüber wie solche Extrakte wirken, welche aus den Lebern von an einer Trypanosomiasis verendeten Tieren herrühren. — Da die Hefe aber Zucker vergärt, so folgt auch aus diesen Versuchen, daß die Wirkung der lebensverlängernden Stoffe der Leberextrakte hauptsächlich eine Wirkung des Leberzuckers ist, und daß der Leberzucker in den vergorenen Extrakten fehlt.

Nachdruck verboten.

Ueber eine Affenseuche.

[Aus dem Serumlaboratorium der Gesellschaft für Seuchenbekämpfung, Frankfurt a. M.-Niederrad.]

Von Dr. **Alexander Lusztig.**

Mit 1 Abbildung im Text.

Von 2 kleinen Macacus rhesus einer Artistentruppe erkrankte nach einer Reise in kühlen Herbsttagen das ältere Tierchen nach einer Vorstellung in Berlin plötzlich an Schüttelfrost mit Atembeschwerden, Husten und allen Erscheinungen einer Lungenentzündung. Der Zustand verschlechterte sich von Tag zu Tag; nach ca. zweiwöchiger Krankheitsdauer mußte das Tier getötet werden.

Während die in dem gemeinsamen Käfig steckenden Tiere, ein Foxterrière und etliche Tauben gesund blieben, erkrankte der andere Affe kurz vor dem Tode des ersten unter ähnlichen Erscheinungen.

Symptome: Seit Beginn der Krankheit schwere Störungen im Allgemeinbefinden. Das sonst äußerst lebhafte, zierliche Tierchen ist traurig, bewegt sich träge und mühsam mit sichtbarer Anstrengung, zittert, Haare gesträubt, Augen matt und jämmerlich; jammert besonders nach dem häufig auftretenden, schmerzhaften Husten, vollkommene Appetitlosigkeit, währenddes nur Weintrauben hie und da genommen werden.

Nasenausfluß gräulich-gelb. Schon bei Beginn der Krankheit vollständige Dämpfung oberhalb der rechten Lunge, die während der ganzen 5wöchigen Krankheitszeit bestehen bleibt. Linke Lunge anfangs normal, später auch Dämpfung mit verschärftem Vesikularatmen und Rasselgeräuschen. Der Auswurf nach dem Husten wird stets wieder verschluckt, was die Sputumuntersuchung sehr erschwert. Untersuchung auf Koch-Bazillen negativ.

Das Tierchen, welches vollkommen zahm geworden war, ist erregbar und nervös, zuckt bei jedem kleinsten Geräusch zusammen und beißt in seinem erregten Zustande die Haut seiner Handteller, besonders an den hinteren Extremitäten vollkommen ab. Von Zeit zu Zeit greift er plötzlich an den Backen, wie bei heftigen Zahnschmerzen; Durchfall ist nicht vorhanden. Puls klein, beschleunigt, Temperatur 39,5°.

Nach 4wöchiger Krankheit plötzlich Verschlechterung des Allgemeinbefindens mit heftigen Atembeschwerden und Tod bald darauf.

Sektionsbefund. Der kleine Kadaver stark abgemagert, die Haut der Handteller abgeschält. Im Magen und Darmkanal wenig flüssiger Inhalt., Schleimhaut mäßig geschwollen. Milz, Leber und Nieren sowie Darmlymphdrüsen unverändert.

In der Brusthöhle wenig trübe Flüssigkeit. Brustfell auf seiner ganzen Oberfläche glanzlos, trübe und mit feinen, weichen, leicht zerreißbaren Fäden besät. Beide Pleurablätter oberhalb der rechten Lunge handtellerbreit miteinander verwachsen, ebenso auf einer Pfennigstück-großen Fläche mit dem Perikard.

Vordere und hintere Lappen der linken Lunge weniger elastisch; Schnittfläche dunkelrot mit feinschaumiger blutreicher Flüssigkeit (Hyperämie). Mittellappen von derber Konsistenz, ihr oberer Teil besitzt noch verminderten Luftgehalt, und beim Zusammendrücken fließt ein roter, etwas schaumiger Saft auf die Schnittflächen (Anschoppung). Der untere Teil dieses Lappens ist derb, schwer, prall, ohne Luftgehalt, gibt beim Einschneiden einen knirschenden Ton und hat körniges Aussehen (Stad. hepatisation. rubr.). Die auffallensten Veränderungen zeigt die rechte Lunge. Alle Lungenlappen sind durch feste, grauweiße Fibrinfäden miteinander verbunden, die Ränder abgerundet, beim Betasten, besonders in den unteren Partien, Knoten fühlbar. Der vordere und hintere Lungenlappen im grauroten Hepatisationsstadium.

Mittlerer Lungenlappen um das 3fache vergrößert, besonders in der Richtung der Längsachse; weist in seiner ganzen Ausdehnung keine Spur von Bronchien, Blut- und Lymphbahnen oder sonstigem Lungengewebe auf und erscheint als dickes,

wurstförmiges, schweres Gebilde mit grauweißer Wand und derbem Inhalt. Beim Einschneiden erscheint es als eine durch dicke, grauweiße, speckartige Bindegewebswände in viele kleine Fächer geteilte Höhle mit käsig-breiigem Inhalt. In den Randpartien sind diese käsig-eiterigen Herde von gleicher Größe, gegen das Zentrum verschwinden allmählich die Wände so, daß in der Mitte eine mit graubläulicher, dickflüssiger, teils breiiger Masse gefüllte Kaverne zum Vorschein kommt. Der Inhalt des zentralen Abszesses etwas dünnflüssiger als jener der parietalen Herde und nicht übelriechend.

Die peribronchialen und mediastinalen Lymphknoten sind mäßig geschwollen und leicht gerötet. Die Bronchialschleimhaut ist blaß, in der rechten Lunge graurot. Parotis geringgradig geschwollen. Wiederholte bakt. Untersuchung auf Tb. negativ.

Aetiologie: Aus den veränderten Lungenteilen wurde ein Mikroorganismus gezüchtet, welcher auf der Agaroberfläche äußerst feine, mit freiem Auge kaum sichtbare, runde, tautropfenähnliche Kolonien bildet. Ueppiger als auf gewöhnlichem Agar ist das Wachstum auf Serumagar, sowie Pferde- oder Rinderblutagar mit 15 Proz. Blutzusatz, wie auch auf Hämoglobinagar. Pferdefleischbouillon wird leicht getrübt mit geringem Bodensatz. Besseres Wachstum wurde in Affenbouillon erzielt (die aus einem Schenkel des Kadavers hergestellt war), insbesondere mit 1 Proz. Traubenzuckerzusatz, sowie auch in Serumbouillon. In Traubenzuckernutrosebouillon (Barsiekow I) Niederschlag und Rötung, in Milchzuckernutrosebouillon (Bars. II) nur starke Trübung. Sowohl von Trauben- wie von Milchzucker wird Gas gebildet. An all diesen Nährböden ist das Wachstum erst am 2.—3. Tag gut sichtbar, nach 1tägiger Bebrütung sind die sehr feinen Kolonien nur mit Lupe zu erkennen und auch im Mikroskop lassen sich die Bakterien nur äußerst spärlich, 4—5 Exemplare in einem Gesichtsfelde, auffinden.

Der Mikroorganismus ist ein Diplococcus und von einer Kapsel umhüllt. Die Kokken sind lanzettförmig, manchmal etwas mehr ausgezogen, lebkuchenherzförmig, manchmal auch oval und nur selten rund. Unter den gleich großen Kokken überragen einige die übrigen 2—3mal. Der Diplococcus wird von allen basischen Anilinfarbstoffen gut gefärbt und auch nach Gram. Sehr gut kommen die Kapseln zum Vorschein bei frischen Serumbouillonkulturen durch kurzes, rasches Einwirken einer wässerigen Karbolfuchsinlösung. Bei älteren Kulturen sind die Kapseln weniger sichtbar.

Sie sind äußerst empfindlich und verlieren auf gewöhnlichen Agarnährböden schon nach 4—5 Tagen ihre Entwicklungsfähigkeit. Die virulentesten sind die Blutagarkulturen, welche, im Brutschrank gehalten, noch nach 2 Monaten aufzufrischen sind.

Die alten, mehrmonatigen Kulturen der Diplokokken stimmen im mikroskopischen Bilde vollkommen mit den frischen überein, höchstens kommt die Kapsel weniger zum Vorschein. Dieses morphologische Verhalten der alten Affenkokkenkulturen unterscheidet sie von den Pneumokokken, mit welchen sie sonst in allen kulturellen und biologischen Eigenschaften übereinstimmen, die aber schon nach 4—5-tägiger Bebrütung zu kurzen Ketten heranwachsen. (Die Lösbarkeit in Rindergalle konnte in frischen Kulturen wegen des spärlichen Wachstums nicht einwandfrei festgestellt werden.)

Dieser Affenpneumokokkus ist ausschließlich in den Lungen nachweisbar und kommt in den Randpartien der vereiterten rechten Lungenlappen sowie an manchen Stellen der zentralen Kaverne in Reinkulturen, in anderen Abszeßpartien und in den frisch hepatisierten,

noch nicht eiterigen Lobulen der linken Lunge aber mit einem anderen Mikroorganismus vergesellschaftet vor.

In den Tierversuchen erwies sich der Kokkus für Mäuse, aber nicht für Meerschweinchen als pathogen. Auch die Mäusepathogenität hörte sehr rasch auf künstlichen Nährböden auf, 6tägige Kulturen rufen nur eine schwere Erkrankung hervor, doch erholten sich nach 2 Tagen die Tiere wieder. Durch Passagen an jungen Mäusen konnte die pathogene Wirkung wieder gesteigert werden.

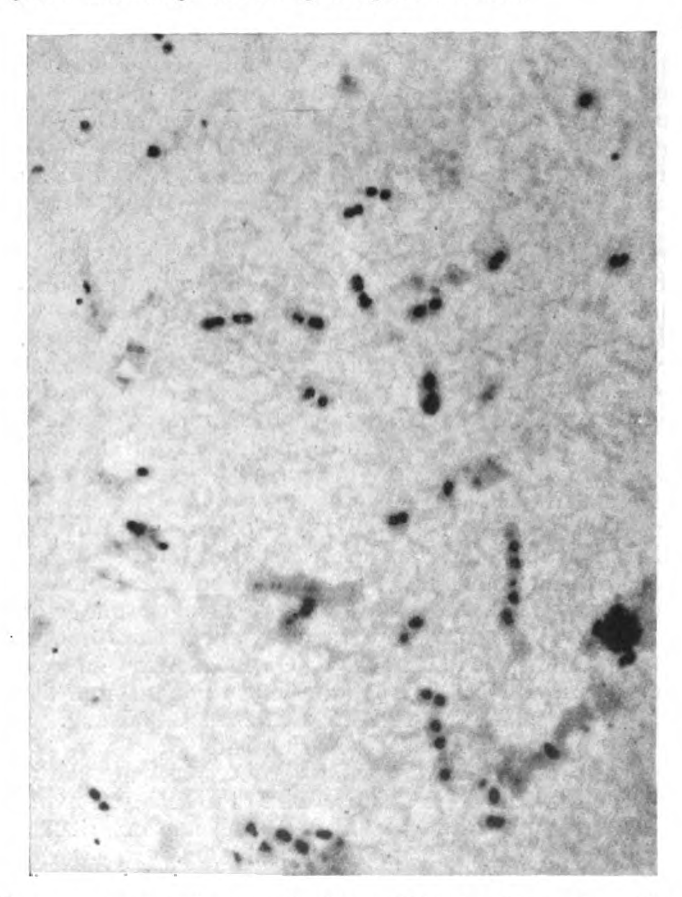


Fig. 1. Affenpneumococcus in Serumbouillon. Zeiß Apochrom. Imm. Vergr. 2000/1

Aus den zentralen Partien der hepatisierten linken Lungenläppchen, von manchen Regionen des Lungenabszesses, sowie von den Lungenlymphknoten, von den parenchymatösen Organen und dem Herzblute konnte noch ein kurzes, abgerundetes, gram-negatives, bewegliches Stäbchen gezüchtet werden, welches auf Agar grauweiße, saftige Kolonien bildet, die Gelatine verflüssigt, in Traubenzucker Gas, auf Conradi-Drigalski rote Kolonien bildet und sowohl Trauben- wie Milchzuckernutrosebouillon (Barsiekow I und II vergärt), Lackmusmolke rötet und in Trypsinbouillon Indol bildet. Es handelt sich um das Bact. coli comm., das ebenfalls mäusepathogen ist. (0,01ccm einer 24stünd. Bouillonkultur tötet die Maus in 18 Std.) Es spielt

hier offensichtlich nur eine sekundäre Rolle, begünstigt die Eiterbildung, beschleunigt die abszedierenden Prozesse und gelangt in dem durch die Kokken geschwächten Organismus schnell in die Blutbahn. Der primäre Krankheitserreger, die Ursache der croupösen Lungenentzündung, welche auch die primären eiterigen Einschmelzungen großer Lungenteile hervorruft, ist aber der Diplococcus, welcher als Pneumococcus simiae bezeichnet werden soll.

Differentialdiagnostisch ist eine Unterscheidung von der Pneumonia tuberculosa caseosa und cavernosa von besonderer Wichtigkeit; sie kann auf Grund des path.-anatomischen Befundes mit Leichtigkeit vorgenommen werden. Bei der Phthisis sind außer den Lungen regelmäßig auch andere Organe, wenn auch in geringerem Maße, stets mit angegriffen. Unter den Bauchorganen weisen Leber, Nieren, Milz, Gekrösedrüsen sehr häufig mit käsigen Massen gefüllte Herde auf, auch ist oft eine Peritonitis fibrinosa vorhanden. Von besonderer Wichtigkeit ist es, daß bei der Tbc. die Erkrankung der Lungen aus den peribronchialen Lymphknoten hervorgeht, wo sich auch die primären Herde entwickeln. Von den Lymphknoten strahlt der Krankheitsprozeß dann auf das Organ selbst über. Der negative bakteriologische Befund von Koch-Bazillen spricht für die Diagnose als Diplokokkenpneumonie.

Trotzdem der Diplococcus der primäre Krankheitserreger ist, so spielt er nur die Rolle eines fakultativen Parasiten. Wahrscheinlich kommt er in den Luftwegen vieler gesunder Affen als Saprophyt vor und wird erst nach Abschwächung der Widerstandsfähigkeit des Wirtorganismus pathogen. In unserem Falle waren Erkältung und körperliche Anstrengung (Reise, Vorführung von Attraktionen) die disponierenden Faktoren. In dem bereits erkrankten Organismus wird die pathogene Eigenschaft dann derartig gesteigert, daß der Diplokokkus nun auch den gesunden Affenorganismus anzugreifen fähig ist.

Die Gefahr liegt nahe, daß die in ihrer Virulenz gesteigerten und pathogen gewordenen Affenpneumokokken auch Quellen menschlicher Pneumonien werden.

Literatur

Schmidt, Maximilian, Krankheiten der Affen. Berlin 1870. Zoolog. Klinik. Bd. 1. — Schlegel, Singes. Leiden 1876. — Weber, Säugetiere; Studien über Säugetiere; Anat. Atlas; Erlebnisse. — Reichenbach, Die vollständige Naturwissenschaft der Affen. — Stannius, Lehrbuch der vergl. Anatomie. — Rudolphi, Anatomische Bemerkungen. — Claus-Grobben, Lehrbuch der Zoologie. — Plate, Allgemeine Zoologie. — Schreber, Säugetiere.

Ein neuer Beitrag zur Frage über die unsterile Immunität und über die Möglichkeit, eine Superinfektion während derselben zu erzeugen.

[Aus dem Wissenschaftlichen Institut für mikrobiologische Untersuchungen an der Moskauer Medizinischen Hochschule (2. Staats-Universität) (Direktor: Prof. Dr. J. L. Kritschewsky).]

Von Dr. **A. M. Brussin** und Dr. **P. L. Rubinstein.**

Die Frage, ob eine Superinfektion möglich ist, wenn der Organismus sich im Zustande sog. „immunitas non sterilisans" befindet, ist bisher

in bezug auf Trypanosomenerkrankungen nicht genügend untersucht worden.

Bis zur letzten Zeit ist keine Arbeit veröffentlicht worden, welche dieser Frage gewidmet wäre, und deren Verfasser über ein so großes Versuchsmaterial verfügt hätten, um diese Frage irgendwie zu klären.

Der Mangel an einer genauen Methode, die es erlaubt hätte, eine infolge der Reinfektion erschienene Parasitenrasse von einer Rezidivrasse der Erstinfektion zu differenzieren, verhinderte eine genaue Untersuchung der Frage. Nachdem Rieckenberg (1) das Phänomen der Blutplättchenbeladung beschrieben hat, und nachdem der große Wert derselben bei der Differenzierung verschiedener Trypanosomenrassen in unserem Institut (2) bestätigt worden ist, sind die erwähnten Schwierigkeiten gewissermaßen beseitigt worden.

Kritschewsky u. Awtonomow (3) haben sich der Rieckenbergschen Methode bedient; im Gegensatz zu den einzelnen Fakten, über welche Koch u. Schilling (4), Ehrlich u. Franke (5) berichten, haben die genannten Autoren auf Grund eines großen Versuchsmaterials festgestellt, daß bei experimenteller Infektion der Mäuse mit Tr. Brucei der Zustand der sog. unsterilen Immunität ausbleibt und nur in exklusiven Fällen eintreten kann. Jedoch hat auch diese Arbeit, trotz des großen Versuchsmaterials und der Genauigkeit der angewandten Methode, nicht vermocht, die Frage über das Wesen der unsterilen Immunität vollständig zu klären. Die Arbeit von Kritschewsky u. Awtonomow hat gezeigt, daß bei der Infektion mit Tr. Brucei die Anwesenheit der Parasiten im Organismus einer Maus das Tier gegen eine Superinfektion mit derselben, eine gleiche Medikamentfestigkeit besitzenden Parasitenart nicht schützen kann. Die Trypanosomenrasse, welche die Verfasser für die Reinfektion benutzten, stammte von einem anderen Rezidiv, als die bei der Erstinfektion gebrauchte Rasse. Jedoch hat das Rieckenbergsche Phänomen gezeigt, daß bei jedem Rezidiv eine neue Trypanosomenrasse entsteht, die sich durch ihre antigenen Eigenschaften von allen vorherigen und nachfolgenden Rezidivrassen unterscheidet. Es war daher höchst interessant, zu untersuchen, ob die von Kritschewsky u. Awtonomow festgestellten Tatsachen auch in dem Falle gelten, wenn die Reinfektion mit einer Rasse ausgeführt wird, die zu demselben Rezidiv gehört, wie auch die Rasse der Erstinfektion[1]). Dieser Frage ist auf Anregung des Prof. J. L. Kritschewsky unsere gegenwärtige Arbeit gewidmet worden.

Es ist bereits festgestellt worden (2), daß bei Mäusen, die mit Tr. equiperdum experimentell infiziert und alsdann geheilt werden, eine Immunität gegen „identische“ Trypanosomenrassen eintritt. Die Identität der Rassen wurde mittels der Rieckenbergschen Reaktion festgestellt, die eine höchst empfindliche Methode darstellt und es erlaubt, die geringste Veränderung der Rassen zu konstatieren.

Auf Grund dieser Tatsachen konnten wir voraussetzen, daß bei Tieren, die von einer Infektion mit Tr. Brucei nicht vollkommen sterilisiert worden sind, eine Immunität gegen die Reinfektion zu konstatieren sein werde, wenn wir für die Reinfektion „identische“ Rassen gebrauchen würden. Dergleichen Versuche sind denn auch angestellt

1) Wir werden weiterhin die Trypanosomenrassen, die bezüglich der Zahl der durchgemachten Rezidive mit der für die Erstinfektion gebrauchten Rasse identisch sind, „identische Rassen“ nennen.

worden; unsere Voraussetzung ist durch dieselben vollkommen bestätigt worden.

Bei unserer Arbeit haben wir 4 Rassen von Tr. Brucei gebraucht, die gegen gewöhnliche therapeutische Salvarsandosen fest waren. Der Umstand, daß wir mit salvarsanfesten Rassen arbeiteten, garantierte uns die Anwesenheit der Parasiten im Organismus nach der Behandlung; die Anwesenheit derselben ist auch mehrfach durch das Eintreten von Rezidiven festgestellt worden. Alle 4 Trypanosomenrassen gehörten zu ein und demselben Stamm; sie differierten untereinander durch ihre verschiedene Salvarsanfestigkeit und durch die Zahl der überstandenen Rezidive. Als Ausgangsrasse diente die salvarsanfeste Rasse „A". Infolge des Eintretens von Rezidiven nach der Behandlung mit Salvarsan 1:500 $(1:800)_5$ (1:1500)[1]) ist aus derselben die Rasse „B" entstanden (Rasse „A" nach 7 Rezidiven). Aus der Rasse „B" ist durch das Eintreten eines Rezidivs nach der Behandlung mit Salvarsan 1:800 die Rasse „C" gewonnen worden, durch das Eintreten eines Rezidivs nach der Behandlung 1:800 dieser letzteren wurde die Rasse „D" erhalten.

Wir wollten zuerst die Möglichkeit einer Superinfektion bei denselben Bedingungen bestätigen, bei welchen Kritschewsky u. Awtonomow ihre Versuche angestellt haben. Deshalb haben wir anfangs mehrere Mäuse, die sich im Zustande einer immunitas non sterilisans befanden, mit Trypanosomenrassen reinfiziert, welche eine weit größere Anzahl Rezidive durchgemacht hatten als die Rasse, mit welcher die Mäuse zuerst infiziert worden waren. Andere Mäuse wurden mit solchen Trypanosomenrassen reinfiziert, die nur 2 Rezidive mehr durchgemacht hatten, als die für die Erstinfektion gebrauchte Rasse (s. Protokoll Nr. I).

Aus dem Protokoll Nr. I ergibt sich, daß bei der Wiederholung der Versuche von Kritschewsky u. Awtonomow ein gleiches Resultat sich ergeben hat. Die Verfasser haben eine Superinfektion mit Rasse „A" bei Mäusen erzeugt, die von Rasse „B" geheilt behandelt worden waren. Wir haben umgekehrt gehandelt: die Mäuse, die von Rasse „A" behandelt worden waren, haben wir mit gutem Erfolg mit der Rasse „B" superinfiziert (s. Mäuse Nr. 1, 2, 3, 4, 5 Prot. Nr. I, Versuch Nr. 1). Mäuse, die von Rasse „B" behandelt worden waren, konnten erfolgreich mit derselben Rasse „B" superinfiziert werden, nachdem die letztere einige Male Meerschweinchen passiert hatte[2]) (Mäuse Nr. 1, 2, 3, 4, Prot. Nr. I, Versuch Nr. 2). Es ist uns auch gelungen, eine Superinfektion mit solchen Rassen zu erzeugen, die nur 2 Rezidive mehr durchgemacht hatten als die bei der Erstinfektion gebrauchte Rasse. So hatte z. B. die Rasse, mit welcher die Mäuse Nr. A und B (Prot. I, Vers. 3) reinfiziert wurden, 2 Rezidive mehr durchgemacht als die Rasse, mit welcher die Mäuse zuerst infiziert worden waren.

Wir erhielten aber ganz andere Resultate, wenn wir eine „identische" Trypanosomenrasse gebrauchten, um die Anwesenheit einer unsterilen Immunität zu konstatieren. (Die Identität der Rassen wurde

---

1) So werden die Salvarsandosen bezeichnet, nach deren Einführung Rezidive eingetreten sind. Die Mäuse erhielten 0,05 ccm entsprechender Salvarsanlösung pro 1 g Gewicht.

2) Es ist bekannt, daß bei Meerschweinchen die Trypanosomen spontan verschwinden, dann wieder im Blutkreis erscheinen können.

mittels der Rieckenbergschen Reaktion festgestellt: siehe Protokoll Nr. II.) Solches Resultat konnte bereits bei der Durchsicht des Protokolls Nr. I vermutet werden.

Bei Maus Nr. 5 (Prot. I, Vers. 2) ist nach der Reinfektion mit einer „identischen" Rasse keine Superinfektion eingetreten; die Tatsache ist besonders bemerkenswert, da bei mehreren Mäusen, die gleichzeitig mit Maus Nr. 5 mit „nicht identischen" Rezidivrassen reinfiziert worden sind, eine Superinfektion eingetreten ist.

Von 34 Mäusen (Prot. Nr. II), die wir mit „identischen" Rassen zu superinfizieren suchten, ist nur bei 5 Mäusen eine Infektion eingetreten. Bei 29 Mäusen wurde der Zustand einer immunitas non sterilisans festgestellt. Bei 17 Mäusen (Nr. 1—17) konnten während einiger Wochen nach der Reinfektion keine Trypanosomen im Blute nachgewiesen werden; wenn aber lange Zeit nach der Infektion Parasiten im Blute erschienen, zeigte das Rieckenbergsche Phänomen stets ihre Angehörigkeit zur Rasse „C", und ihre Erscheinung mußte folglich als ein Rezidiv der 1. Infektion betrachtet werden.

Bei 7 Mäusen (Nr. 18—24) ist ein Rezidiv der 1. Infektion wenige Tage nach der Reinfektion eingetreten (nach 1—3 Tagen bei 2 Mäusen und nach 5—7 Tagen bei 5 Mäusen). Da die Reinfektion mit einer nicht identischen Rezidivrasse als Regel nicht später als am 3. Tage eintritt, müssen wir annehmen, daß bei den 5 letzteren Mäusen keine Superinfektion eingetreten ist.

Bei 5 Mäusen (Nr. 25—29) sind am 4.—5. Tage nach der Reinfektion Trypanosomen erschienen, die weder mit der erwarteten Rezidivrasse noch mit der für die Reinfektion gebrauchten Rasse „B" identisch waren. Da diese Mäuse nicht später als am 17. Tage nach der Behandlung der 1. Infektion reinfiziert worden sind (Ausnahme: Maus Nr. 25), d. h. nach solch einer Frist, wenn die Mäuse meistens noch nicht superinfiziert werden können, muß das Erscheinen der Trypanosomen als ein Rezidiv der 1. Infektion betrachtet werden. Zwar waren diese Trypanosomen mit der erwarteten Rezidivrasse nicht identisch (Rieckenbergsches Phänomen), jedoch widerspricht dieser Umstand keineswegs unserer obigen Vermutung. Es wurden nämlich die Mäuse vor der Reinfektion nur selten untersucht, und es konnten zwischen zwei Untersuchungen kurzdauernde Rezidive stattfinden, die unbemerkt blieben. Infolgedessen konnte das 1. beobachtete Rezidiv in der Tat nicht das erste sein. Beim Vergleich der im Blut erschienenen Rasse mit der erwarteten Rasse (eines 1. Rezidivs) mittels der RR.[1]) müßte in solchem Falle ein negatives Resultat sich ergeben, weil ja die RR. ein höchst sensibles Instrument darstellt. Es sind auch solche Fälle bereits konstatiert worden (Brussin u. Beletzky, Kritschewsky u. Awtonomow).

In derselben Weise kann auch der negative Ausfall der RR. mit den Rezidivrassen bei Mäusen Nr. 15 und 16 (Prot. Nr. II) erklärt werden, bei denen das Ausbleiben einer Superinfektion durch das Erscheinen der Trypanosomen erst am 16.—17. Tage nach der Reinfektion bestätigt wird.

Es ist also von 34 Mäusen, die sich im Zustande einer immunitas non sterilisans befanden, nur bei 5 Mäusen eine Superinfektion festgestellt worden (Mäuse Nr. 30—34, Prot. II).

1) RR. = Rieckenbergsche Reaktion.

Wenn man die Protokolle bezüglich der 5 Mäuse, bei denen eine Superinfektion stattgefunden hat, genauer studiert, kann man einige Schlüsse über den Mechanismus der unsterilen Immunität ziehen.

Fast alle Tiere, bei denen eine Superinfektion gelungen ist, sind erst lange Zeit nach der Behandlung reinfiziert worden (35 Tage und später) mit Ausnahme der Maus Nr. 34, die am 20. Tage nach der Behandlung reinfiziert worden ist. Wenn wir aber die Mäuse nach solch einer Frist reinfizierten, nach welcher Kritschewsky u. Awtonomow in den meisten Fällen eine Superinfektion erzeugt hatten, haben wir, als Regel, eine Immunität konstatiert.

Um das Resultat der Fälle, in welchen bei unserer Versuchsanstellung eine Superinfektion gelungen ist, richtig zu verwerten, war es notwendig, den Mechanismus der immunitas non sterilisans, die wir konstatiert hatten, und die eine Reinfektion mit „identischen" Rassen verhindert, zu klären, d. h. zu zeigen, ob der erwähnte Zustand durch trypanozide Antikörper bedingt ist, die sich bei der Behandlung der Mäuse infolge des Zugrundegehens vieler Trypanosomen gebildet haben, oder durch die Anwesenheit von Parasiten im Organismus, die bei der Behandlung am Leben geblieben und auch durch die nachfolgende Wirkung der Antikörper nicht vernichtet worden sind.

Viele Autoren sind der Meinung, daß bei der Behandlung infolge des Zugrundegehens der Trypanosomen trypanozide Antikörper im Organismus sich bilden. Die Versuche von Ehrlich u. Franke (5) weisen auf das Vorhandensein solcher Antikörper hin. Es konnten nämlich Mäuse, die mit Tr. Mal de Caderas infiziert und durch eine Injektion von Trypanrot geheilt waren, vor dem 20. Tage nicht reinfiziert werden, obwohl der Reinfektionsversuch alle 2 Tage wiederholt wurde. Mäuse, die mit Tr. equiperdum infiziert und alsdann durch Salvarsan vollkommen sterilisiert sind, bleiben während $2^1/_2$ bis 3 Monate immun gegen „identische" Rassen (2). Die hier angegebenen Tatsachen erlauben die Annahme, daß die sterile Immunität in dem Falle, wenn wir dieselbe nach der Behandlung konstatieren können, durch trypanozide Antikörper bedingt sein kann, die sich nach der Behandlung gebildet haben.

Folgende Erwägungen geben uns die volle Ueberzeugung, daß die Anwesenheit solcher trypanoziden Antikörper den einzigen Grund der Unempfindlichkeit der Tiere gegen eine Reinfektion mit „identischen" Rassen darstellt, und daß der Grund solcher Unempfindlichkeit folglich in keiner Verbindung mit der Anwesenheit der Parasiten im Organismus steht. Die Antikörper, welche den Untergang der bei der Reinfektion in den Organismus eingeführten Trypanosomen verursachen, müssen, selbstverständlich, ebenfalls auf die nach der Behandlung am Leben gebliebenen Parasiten ihre Wirkung ausüben. Die Tatsache, daß diese letzteren, im Gegensatz zu den bei der Reinfektion eingeführten Trypanosomen, nicht vernichtet werden, zeigt, daß die im Organismus erhaltenen Parasiten unempfindlich gegen jene Antikörper geworden sind, welche sich infolge des Untergangs von Trypanosomen während der Behandlung im Organismus gebildet haben. Mit anderen Worten: wir begegnen in einem unsterilisierten Organismus einer neuen Trypanosomenrasse, welche durch den Einfluß der Antikörper verändert worden ist. Diese Ansicht stimmt auch mit den Ansichten von Ehrlich, Röhe u. Gulbranson (6), welche gezeigt haben, daß Trypanosomen durch die Wirkung der Antikörper

verändert werden; die eingetretene Veränderung weist sich dadurch auf, daß die Trypanosomen unempfindlich gegen die im Blute vorhandenen Antikörper werden, und auch dadurch, daß ihre antigenen Eigenschaften geändert werden.

Es ergibt sich hieraus, daß, wenn bei der Reinfektion eine Trypanosomenrasse verwendet wird, die mit der für die 1. Infektion gebrauchten identisch ist (eine gleiche Zahl Rezidive durchgemacht hat), diese Rasse jedoch mit der veränderten Rasse, die im Organismus nach der Behandlung erhalten geblieben ist, nicht identisch sein wird.

Die Tatsache, daß die Anwesenheit von Parasiten im Organismus keine Unempfindlichkeit gegen eine andere (nicht identische) Parasitenrasse verursacht, ist aus unseren Versuchen zu ersehen, und ebenfalls aus den Versuchen von Kritschewsky u. Awtonomow. Diese Autoren haben Mäuse mit Trypanosomen reinfiziert, die zu verschiedenen Rezidivrassen gehörten. Die Wirkung der trypanoziden Antikörper, die sich infolge des Unterganges der Trypanosomen während der Behandlung gebildet hatten, wurde bei diesen Versuchen gänzlich beseitigt, da für die Reinfektion eine „nicht identische" Trypanosomenrasse gebraucht wurde; die Anwesenheit von solchen Parasiten im Organismus, die nach der Behandlung am Leben geblieben sind und die ebenfalls mit der neueingeführten Rasse nicht identisch sind, kann aber das Tier vor einer Superinfektion nicht schützen.

Die 5 Fälle, in denen es uns gelungen ist, bei unserer Versuchsanstellung eine Superinfektion zu erzeugen, stehen in voller Uebereinstimmung mit den obigen Tatsachen. Obwohl die im Organismus erhalten gebliebenen Trypanosomen von der für die Reinfektion gebrauchten Rasse stammen, besitzen sie doch neue antigene Eigenschaften, die sie während des Kampfes ums Dasein erworben haben. Schon aus diesem Grunde allein können die im Organismus erhalten gebliebenen Trypanosomen einer Reinfektion mit ihren Vorgängern nicht widerstehen. Nur die Anwesenheit von trypanoziden Antikörpern, die während der Behandlung infolge des Unterganges der noch unveränderten Trypanosomen entstanden sind, könnte die Reinfektion verhindern. Das Eintreten einer Reinfektion zeigt nur, daß diese Antikörper gänzlich aus dem Organismus ausgeschieden oder daß nur Spuren derselben geblieben sind. Dieser Satz wird durch die Tatsache bestätigt, daß die oben erwähnten 5 Mäuse eben nach den längsten Zeiträumen nach der Behandlung reinfiziert worden sind. So ist die Maus Nr. 31 (Prot. Nr. II) am 46. Tage nach der Behandlung der Erstinfektion reinfiziert worden; Maus Nr. 32 — am 42. Tage. Zur Zeit der Reinfektion konnten im Blute dieser Mäuse keine Reagine gegen die für die Superinfektion gebrauchte Rasse nachgewiesen werden[1]).

Es ist aber in bezug auf Tr. equiperdum erwiesen worden, daß im Blute der Versuchstiere auch in dem Falle Reagine sich auffinden lassen, wenn die Anzahl der trypanoziden Antikörper ungenügend ist, um eine Reinfektion zu verhindern (2). Deshalb können wir mit vollem

1) Im gegebenen Falle kann ein negatives Resultat der Rieckenbergschen Reaktion noch keineswegs beweisen, daß die für die Reinfektion gebrauchte Rasse mit der Rasse der Erstinfektion nicht identisch ist; diese Trypanosomenrasse ist nämlich in Mäusen gezüchtet worden und stets regelmäßig überimpft worden, wobei die Mäuse sorgfältig beobachtet wurden und keine Schwankungen der Parasitenzahl im Blute ergaben. Auf diese Weise wurden alle Momente ausgeschlossen, die die Rasse in bezug auf die RR. hatten verändern können.

Recht sagen, daß bei den Mäusen Nr. 31 und 32 keine Antikörper gegen die letzteingeführte Trypanosomenrasse vorhanden sind. Obwohl im Organismus Parasiten anwesend sind, die nach der Behandlung am Leben geblieben sind, gelingt jedoch die Reinfektion am 5. Tage; die RR. zeigt, daß die Trypanosomen, welche nach der Reinfektion im Blute erscheinen, mit der für die Superinfektion gebrauchten Rasse identisch sind.

Die Mäuse Nr. 30 und 33 (Prot. II) sind am 35. Tage reinfiziert worden, die Maus Nr. 34 (Prot. II) am 20. Tage (bei positiver RR.). Die Ungenügendheit der bei diesen Tieren vorhandenen Menge von trypanoziden Antikörpern äußert sich in einer Unterdrückung der nach einer Superinfektion aufgetretenen Trypanosomen; solche Unterdrückung äußert sich durch eine schwach positive RR. mit dem Blute der Mäuse, die von der Reinfektionsrasse geheilt worden sind. Dergleichen Tatsachen sind auch früher notiert worden (2). Bei Maus Nr. 30 (Prot. Nr. II) sind gleichzeitig Rezidiv und Superinfektion beobachtet worden.

Die Frage, ob die im Organismus erhalten gebliebenen Trypanosomen denselben immun gegen eine Superinfektion mit einer „identischen“ Rasse machen können, bleibt ungeklärt. Die Lösung dieser Frage würde jedoch nur ein theoretisches Interesse darstellen und keinen praktischen Wert haben. Man kann wohl zulassen, daß ein Tierorganismus experimentell durch solche Trypanosomen infiziert werden kann, die derselben Rezidivrasse angehören, welche für die Erstinfektion gebraucht worden sei; man könnte sich aber solchen Fall gar nicht vorstellen, wo ein Organismus mit einer Trypanosomenrasse reinfiziert werden könnte, die mit jener Rasse identisch sei, welche in demselben nach einer Behandlung erhalten geblieben wäre und neue antigene Eigenschaften erworben hätte.

Aus allem Gesagten können wir schließen, daß die unsterile Immunität, die wir konstatiert haben, und die sich durch die Unmöglichkeit, eine Superinfektion mit einer „identischen“ Trypanosomenrasse zu erzeugen, äußert, durch trypanozide Antikörper bedingt ist, die sich bei der Behandlung eines Organismus infolge des Unterganges der Trypanosomen bilden. Hieraus folgert sich, daß die unsterile Immunität, nach ihrem Mechanismus, der sterilen Immunität vollkommen gleicht. Sie dauert im Organismus nur, bis Antikörper in demselben vorhanden sind, oder bis die Zellen desselben fähig sind, Antikörper zu produzieren. Die Dauer einer unsterilen Immunität steht in keiner Verbindung mit der Anwesenheit von Parasiten im Organismus. Der Zustand „immunitas non sterilisans“, welcher als die Aeußerung einer besonderen Immunität betrachtet wurde (dieselbe sei, im Gegensatz zu allen anderen Formen derselben, durch die Anwesenheit lebendiger Infektionserreger im Organismus verursacht), existiert folglich gar nicht; wenigstens ist das der Fall bei der Infektion mit Tr. Brucei, die wir untersucht haben.

Unsere Ergebisse widersprechen keineswegs den Resultaten, zu welchen Kritschewsky u. Awtonomow in ihrer Arbeit gekommen sind. Die Tatsache, daß die Verfasser im größten Teil ihrer Versuche eine Superinfektion erzeugt haben, wenn das Versuchstier sich im Zustande einer „immunitas non sterilisans“ befand, und daß sie es kurze Zeit nach der Behandlung tun konnten, kann von unserem Gesichtspunkte aus leicht erklärt werden. Die Verfasser haben sich nur mit

der Frage befaßt über eine unsterile Immunität gegen Rassen, die alle zu derselben Spezies gehörten, zu welcher die Rasse der Erstinfektion gehörte, und eine gleiche Medikamentfestigkeit besaßen. Die Autoren haben daher für die Reinfektion solche Trypanosomenrassen gebraucht, die mit der Rasse der Erstinfektion nicht „identisch" waren (verschiedene Zahl der durchgemachten Rezidive). Sogar solche von Kritschewsky u. Awtonomow festgestellten Tatsachen, wie das abwechselnde Erscheinen und Verschwinden einer unsterilen Immunität, und wie die Möglichkeit einer zweifachen Superinfektion, bestätigen vollkommen den Schluß, zu dem wir in unserer Arbeit gekommen sind. Die Mäuse Nr. 10 und 11[1]), deren Krankheitsgeschichten die Möglichkeit gegeben haben, das abwechselnde Erscheinen und Verschwinden einer unsterilen Immunität zu erklären, konnten leicht mit der salvarsanfesten Rasse Tr. Brucei „A" superinfiziert werden, da dieselbe drei Rezidive mehr durchgemacht hatte als die Rasse, mit der die Mäuse anfangs infiziert worden sind. Infolge der Reinfektion ist bei diesen Mäusen eine salvarsanfeste Rasse „A" erschienen; die Tiere wurden behandelt. Die Behandlung verursachte bei den Mäusen einen neuen Zustand, nämlich eine unsterile Immunität gegen Rasse „A". Infolgedessen ist die Reinfektion mit einer identischen (gleiche Anzahl von Rezidiven) Rasse „A", die 2 Monate nach der Behandlung unternommen wurde, resultatlos geblieben. Zwar ergibt sich aus unserer Arbeit, daß trypanozide Antikörper aus dem Organismus nach 2 Monaten bereits ausgeschieden sind. Wenn man aber in Betracht zieht, welch einen großen Einfluß die Individualität eines jeglichen Tierorganismus auf die Dauer der Immunität hat [die Tatsache ist schon von Ehrlich nachgewiesen worden (5)], erscheint die obige Vermutung glaubenswert.

Die 3 Mäuse [Nr. 5, 14 und 2[2])], bei welchen eine zweifache Superinfektion erzeugt worden ist, sind anfangs mit einer salvarsanfesten Rasse, Tr. Brucei, infiziert worden, die fast ebenso viel Rezidive durchgemacht hatte wie die Rasse „B". Am 13.—14. Tage wurde eine Reinfektion mit einer nicht „identischen" Rasse „A" unternommen; wie zu erwarten, ergab die Reinfektion ein positives Resultat. Die Tatsache aber, daß es gelungen ist, die Mäuse lange Zeit nach der Behandlung der 2. Infektion[3]) zum 3. Male mit der Rasse „A" zu infizieren (dieselbe war mit der Rasse der vorherigen, nicht gänzlich geheilten Infektion identisch), steht in voller Uebereinstimmung mit den 5 Fällen, in denen wir eine Superinfektion in unseren Versuchen haben erzeugen können. Die 3 Fälle, die von Kritschewsky u. Awtonomow erbracht worden sind, können deshalb durch dieselben Argumente erklärt werden, welche oben bezüglich der Mäuse Nr. 30, 31, 32, 33 und 34 (Prot. II) angeführt worden sind.

In der Arbeit von Kritschewsky u. Awtonomow sind die Krankheitsgeschichten zweier Mäuse (Nr. 12, Prot. II, und Nr. 3, Prot. IV) von großem Interesse; diese Mäuse konnten mit einer Rasse, die mit der Rasse der Erstinfektion nicht identisch war, nicht superinfiziert werden; diese Tatsache bildet einen Grundwiderspruch mit unseren Ergebnissen.

---

1) Auszug aus dem Protokoll Nr. 1 aus der oben zitierten Arbeit von Kritschewsky und Awtonomow.

2) Kritschewsky u. Awtonomow, l. c., Maus Nr. 5 s. Prot. II, Maus Nr. 14 s. Prot. III, Maus Nr. 2 s. Prot. IV.

3) Am 26., am 32. und am 47. Tage nach der 2. Behandlung.

Hieraus ist zu ersehen, daß es im Mechanismus der unsterilen Immunität noch solche Momente gibt, die noch gründlich untersucht werden müssen. Es können aber solche einzelnen Fälle, die eine seltene Ausnahme bei unseren zahlreichen Versuchen bilden, den Satz nicht umstürzen, welchen wir aufgebaut haben, nämlich, daß eine unsterile Immunität erzeugt werden kann, wenn man für die 1. und 2. Infektion identische (gleiche Rezidive) Trypanosomenrassen gebraucht. Die Tatsache, daß die Anwesenheit einer Immunität keineswegs durch die Anwesenheit von Parasiten im Organismus verursacht wird, kann auch trotz der soeben erwähnten Ausnahmefälle als festgestellt gelten.

Zusammenfassung.

I. Bei Mäusen, die mit salvarsanfesten Rassen des Tr. Brucei experimentell infiziert und alsdann mit üblichen therapeutischen Salvarsandosen behandelt worden sind, tritt der Zustand einer sog. unsterilen Immunität ein. Diese ist streng spezifisch gegenüber Trypanosomenrassen, die mit der Rasse der Erstinfektion identisch sind, d. h. wenn die beiden Rassen eine gleiche Anzahl Rezidive durchgemacht haben. (Die Identität der Trypanosomenrassen wurde immer mittels der Rieckenbergschen Reaktion festgestellt.) — II. Der Mechanismus einer unsterilen Immunität gegen identische Trypanosomenrassen ist ganz analog dem Mechanismus einer völligen Sterilisation des Organismus; in beiden Fällen dauert die Immunität so lange, als die Antikörper noch nicht verschwunden sind oder als die Körperzellen die Fähigkeit besitzen, Antikörper zu produzieren. Das Vorhandensein einer Immunität steht in keinem direkten Zusammenhang mit der Anwesenheit lebender Parasiten im Organismus. — III. Es gibt tatsächlich keine „immunitas non sterilisans", die als eine besondere Immunitätsform betrachtet werden könnte, und die im Gegensatz zu anderen Immunitätsphänomenen von der Anwesenheit lebender Parasiten im Organismus abhängig ist. Dieser Satz ist von uns in bezug auf Tr. Brucei festgestellt worden. — IV. Eine unsterile Immunität, d. h. die Unmöglichkeit, eine Superinfektion mit einer „identischen" Trypanosomenrasse zu erzeugen, hat keine bestimmte Dauer. Nach unseren Beobachtungen und nach denen von Kritschewsky u. Awtonomow kann eine unsterile Immunität 20 Tage bis 2 Monate dauern.

Protokoll I.

Die Mäuse wurden mit salvarsanfesten Rassen Tr. Brucei infiziert und alsdann mit solchen Dosen Salvarsan behandelt, durch welche der Organismus nicht total sterilisiert werden konnte. Nach bestimmten Zeitintervallen nach der Behandlung, aber nicht früher als am 12.—13. Tage[1]) wurden die Mäuse mit Trypanosomen reinfiziert, die zu verschiedenen Rezidivrassen gehörten, nicht aber zu der Rasse, welche für die 1. Infektion gebraucht worden war. Der negative Ausfall der „RR."[2]) bestätigte jedes Mal, daß die für die Reinfektion gebrauchten Parasiten

1) Während 12—13 Tagen scheidet sich das Salvarsan gänzlich aus dem Tierorganismus aus (s. Kritschewsky u. Brussin, Ztschr. f. Immun. Bd. 39. 1924).

2) RR. = Rieckenbergsche Reaktion.

mit denen der Erstinfektion nicht identisch waren. Die RR. wurde folgenderweise angestellt: Die Trypanosomen wurden mit dem Blute der Mäuse, welche reinfiziert werden sollten, gemischt. Wenn nach der Reinfektion Trypanosomen im Blute erschienen, wurden dieselben mittels der RR. mit einer der erwarteten Rezidivrasse gleichen Trypanosomenrasse und mit der für die Superinfektion gebrauchten Rasse verglichen.

Versuch Nr. 1. Mäuse Nr. 1, 2, 3, 4, 5 sind zu verschiedener Zeit von der Infektion mit Tr. Brucei „A" behandelt worden. Alle Mäuse sind nicht früher als nach 14 Tagen mit Tr. Brucei „B" reinfiziert worden, von einer Maus, deren Blut 5/1 [1]) Trypanosomen enthielt (bei negativer RR.). Bei allen Mäusen sind am 3. Tage Trypanosomen erschienen. Mittels der RR. ist die volle Identität der erschienenen Trypanosomen mit der für die Superinfektion gebrauchten Rasse „B" festgestellt worden.

Versuch Nr. 2. 4 Mäuse aus dem Versuch Nr. 1 sind auf der Höhe der Infektion (Rasse „B") mit alkalischer Arsolanlösung 1:800 (0,05 ccm pro 1 g Tier) behandelt worden und am 22. Tage nach der Behandlung zum 3. Mal infiziert worden mit Tr. Brucei, Rasse „B1" [2]), von einer Maus, deren Blut 10/1 Tryp. enthielt (RR. negativ). Jeder Maus sind 3 Tropfen Blut eingeführt worden.

Die 5. Maus ist bei scharf positiver RR. mit Rasse „B" infiziert worden, die in bezug auf die Zahl der durchgemachten Rezidive mit der für die Reinfektion gebrauchten Rasse identisch war.

Die ersten 4 Mäuse (Nr. 1, 2, 3, 4) sind am 3. Tage erkrankt, wobei die im Blute erschienenen Trypanosomen mit der für die 3. Infektion gebrauchten Rasse identisch waren; wenn sie mit dem Blute einer von der Rasse „B1" behandelten Maus gemischt wurden, war die RR. scharf positiv. Bei Maus Nr. 5 sind nach der 3. Infektion keine Trypanosomen erschienen. Das Tier ist während 20 Tage beobachtet worden, wonach es aus unbekanntem Grunde umgekommen ist.

Versuch Nr. 3. Maus Nr. „A" — 17 g, bei viele/1 behandelt von Rasse „B" mit alkalischem Arsolan 1:800. Am 23. Tage reinfiziert mit Rasse „D" [3]) bei 1/5 Tryp. und bei negativer RR. Am 3. Tage sind Trypanosomen im Blute erschienen (1/5); mittels der RR. ist festgestellt worden, daß die Trypanosomen teils zur Rasse „C", d. h. zu der erwarteten Rezidivrasse, gehörten, teils aber zu der für die Superinfektion gebrauchten Rasse „D". Es wurde also in diesem Falle das gleichzeitige Eintreten eines Rezidivs mit einer Superinfektion konstatiert. Die Maus ist an der Infektion umgekommen.

Maus Nr. „B" — 17 g, ist mit Tr. Brucei „B" infiziert worden und bei viele/1 mit alkalischer Arsolanlösung 1:800 behandelt worden. Am 20. Tage nach der Behandlung ist sie mit der Rasse „D" (Tryponosomenzahl 1/5) infiziert worden (5 Tropfen Blut eingeführt). Am 3. Tage nach der Reinfektion sind Trypanosomen im Blute erschienen (1/2). Die RR. hat, wie auch im obigen Falle, das gleichzeitige Entstehen eines Rezidivs und einer Superinfektion gezeigt.

Maus Nr. „C" — 15 g, ist bei 4—5/1 (Rasse „B") mit alkalischer Arsolanlösung 1:800 behandelt worden. Am 15. Tage nach der Behandlung ist die Maus bei negativer RR. mit Rasse „D" infiziert worden. Am 4. Tage nach der Reinfektion sind Trypanosomen im Blute erschienen (1/Präparat). Da aber die Zahl der Trypanosomen im Blute sehr unbeständig war (dieser Umstand ist von großem Einfluß auf den Ausfall der RR.) (2), ist es uns nicht gelungen, die Identität der erschienenen Parasiten weder mit einer dem erwarteten Rezidiv entsprechenden Rezidivrasse noch mit der für die Reinfektion benutzten Rasse festzustellen. Das Tier ist aus dem Versuch entlassen worden.

Protokoll II.

Die Mäuse wurden mit der salvarsanfesten Rasse Tr. Brucei „B" infiziert und auf der Höhe der Infektion mit alkalischer Salvarsanlösung 1:800 und 1:400 (0,05 ccm pro 1 g Tier) behandelt. Nach 15—16 Tagen und später wurden die Mäuse mit derselben Trypanosomenrasse reinfiziert. Die Identität derselben mit der

---

1) Der Zähler bedeutet die Zahl der Trypanosomen, der Nenner die Zahl der Gesichtsfelder.

2) Durch „B1" wird dieselbe Rasse „B" bezeichnet, nachdem sie einigemal in Meerschweinchen passagiert worden ist und dann wieder auf eine Maus übergeimpft ist. Bei Meerschweinchen nimmt die Infektion, wie bekannt, einen chronischen Verlauf an: die Trypanosomen können spontan aus dem Blute verschwinden und dann wieder erscheinen.

3) Die Charakteristik der Trypanosomenrassen s. S. 371.

ersten Rasse wurde mittels der RR. (mit dem Blute der Maus, welche reinfiziert werden sollte) festgestellt. Die nach der Reinfektion erschienenen Trypanosomen wurden mittels der RR. untersucht, ob sie mit der Rasse „C“ [1]), d. h. mit der Rasse, welche im Falle eines Rezidivs der 1. Infektion im Mäuseorganismus erscheinen müßte, oder mit der Rasse „B“ [2]), die für die Superinfektion gebraucht worden war, identisch seien.

Maus Nr. 1 — Gew. 16 g. Bei viele/1 behandelt mit Novoarsolan 1:500. Am 15. Tage nach der Behandlung reinfiziert mit 5 Tropfen Mäuseblut, welches 5—6/1 Tryp. enthielt. Während 29 Tagen ist keine Infektion entstanden. Am 29. Tage nach der Reinfektion wurde eine 3. Infektion unternommen: die Maus erhielt 9 Tropfen Blut (Trypanosomenzahl 1/5, RR. scharf positiv). Am 7. Tage nach der 3. Infektion sind Trypanosomen erschienen (1/2), die sich als ein Rezidivstamm verhielten:

RR. mit Rasse „B“ = negativ,
„ „ „ „C“ = scharf positiv.

Die Maus ist aus dem Versuch entlassen worden.

Maus Nr. 2 — Gew. 15 g, ist bei viele/1 mit Novoars. 1:800 behandelt worden. Am 15. Tage nach der Behandlung reinfiziert mit 5 Tropfen Mäuseblut, welches 5—6/1 Tryp. enthielt; während 29 Tagen ist keine Infektion eingetreten. Am 29. Tage nach der Reinfektion wurde eine 3. Infektion unternommen mit 9 Tropfen Mäuseblut, welches 1/5 Tryp. enthielt (RR. scharf positiv). 7 Tage später, d. h. am 50. Tage nach der 1. Behandlung, sind Trypanosomen erschienen (3/1), die sich als eine Rezidivrasse verhielten:

RR. mit Rasse „B“ = negativ,
„ „ „ „C“ = scharf positiv.

Die Maus ist aus dem Versuch entlassen worden.

Maus Nr. 3, Gew. 17 g, ist bei viele/1 mit alkalischer Arsolanlösung 1:800 behandelt worden. Am 16. Tage nach der Behandlung reinfiziert mit 4 Tropfen Mäuseblut, welches 3/1 Tryp. enthielt (RR. scharf positiv). Während 28 Tagen sind keine Trypanosomen im Blute nachgewiesen worden. † aus unbekanntem Grunde.

Maus Nr. 4, Gew. 15 g, ist mit Rasse „D“ infiziert und bei viele/1 mit alkalischer Arsolanlösung 1:800 behandelt worden. Am 17. Tage nach der Behandlung reinfiziert mit Rasse „D“: das Tier erhielt 4 Tropfen Mäuseblut, welches 5/1 Tryp. enthielt (RR. scharf positiv). Während 87 Tagen keine Trypanosomen im Blute. † aus unbekanntem Grunde.

Maus Nr. 5, Gew. 14 g, ist bei viele/1 mit alkal. Arsolanlösung 1:800 behandelt worden. Am 26. Tage nach der Behandlung reinfiziert mit 3 Tropfen Mäuseblut, welches 8/1 Tryp. enthielt (RR. scharf positiv). Während 50 Tagen keine Trypanosomen im Blute. † aus unbekanntem Grunde.

Maus Nr. 6, Gew. 15 g, ist bei viele/1 mit alkal. Arsolanlösung 1:800 behandelt worden. Am 14. Tage nach der Behandlung reinfiziert mit 5 Tropfen Mäuseblut, welches 5/10 Tryp. enthielt (RR. scharf positiv). Während 18 Tagen keine Trypanosomen im Blute. Am 18. Tage † aus unbekanntem Grunde.

Maus Nr. 7, Gew. 18 g, ist bei 4—5/1 mit alkal. Arsolanlösung 1:400 behandelt worden. Am 16. Tage nach der Behandlung reinfiziert mit 4 Tropfen Mäuseblut, welches 3/1 Tryp. enthielt (RR. scharf positiv). Keine Superinfektion eingetreten.

Maus Nr. 8, Gew. 24 g, ist bei 10—12/1 mit alkal. Arsolanlösung 1:400 behandelt worden. Weiteres wie bei Maus Nr. 7.

Maus Nr. 9, Gew. 23 g, ist bei 10/1 mit alkal. Arsolanlösung 1:400 behandelt worden. Weiteres wie bei Maus Nr. 7.

Maus Nr. 10, Gew. 17 g, ist bei 8/1 mit alkal. Arsolanlösung 1:400 behandelt worden. Weiteres wie bei Maus Nr. 7.

Maus Nr. 11, Gew. 20 g, ist bei 10/1 mit alkal. Arsolanlösung 1:400 behandelt worden. Weiteres wie bei Maus Nr. 7.

Maus Nr. 12, Gew. 17 g, ist bei 15/1 mit alkal. Arsolanlösung 1:400 behandelt worden. Weiteres wie bei Maus Nr. 7.

Maus Nr. 13, Gew. 16 g, ist bei 6/1 mit alkal. Arsolanlösung 1:400 behandelt worden. Weiteres wie bei Maus Nr. 7.

Maus Nr. 14, Gew. 18 g, ist mit Rasse „C“ infiziert und bei viele/1 mit Novoarsolan 1:800 behandelt worden. Am 14. Tage nach der Behandlung reinfiziert mit Rasse „C“: 5 Tropfen Mäuseblut eingeführt, welches 7/20 Tryp. enthielt (RR. scharf positiv). Keine Superinfektion eingetreten.

1) 2) D. h. die nach der Reinfektion erschienenen Trypanosomen wurden mit dem Blute von Mäusen gemischt, die von Rasse „C“ oder von Rasse „B“ kuriert worden waren.

Maus Nr. 15, Gew. 22 g, ist bei viele/1 mit alkal. Arsol. 1:800 behandelt worden. Am 14. Tage nach der Behandlung reinfiziert mit 2 Tropfen Mäuseblut, welches viele/1 Tryp. enthielt (RR. scharf positiv). Am 17. Tage nach der Reinfektion sind Trypanosomen im Blute erschienen (3/1), die jedoch weder mit Rasse „B" noch mit Rasse „C" eine positive RR. zeigten.

Maus Nr. 16, Gew. 20 g, ist bei viele/1 mit alkal. Arsolanlösung 1:800 behandelt worden. Am 19. Tage nach der Behandlung reinfiziert mit 4 Tropfen Mäuseblut, welches 4—5/1 Tryp. enthielt (RR. scharf positiv). Am 16. Tage nach der Reinfektion sind Trypanosomen im Blute erschienen (4/10).

RR. mit Rasse „B" = negativ,
„ „ „ „C" = negativ.

Maus Nr. 17, Gew. 17 g, ist mit Rasse „D" infiziert und bei 7/1 mit alkal. Arsol. 1:800 behandelt worden. Am 13. Tage nach der Behandlung reinfiziert mit 4 Tropfen Mäuseblut, welches 4/1 Tryp. enthielt (RR. scharf positiv). Am 16. Tage nach der Reinfektion sind Trypanosomen im Blute erschienen (1/1).

RR. mit Rasse „D" = negativ.

Leider ist keine RR. mit einer dem erwarteten Rezidiv entsprechenden Rasse angestellt worden, da zu der Zeit keine Maus uns zur Verfügung stand, die von solch einer Rasse geheilt worden sei.

Maus Nr. 18, Gew. 20 g, bei 20/1 behandelt mit Novoarsolan 1:500. Am 13. Tage nach der Behandlung reinfiziert mit 5 Tropfen Mäuseblut, welches 5/1 Tryp. enthielt. Am folgenden Tage wurden Trypanosomen im Blute nachgewiesen (4—5/1).

RR. mit Rasse „B" = negativ,
„ „ „ „C" = positiv.

Bei viele/1 zum zweiten Mal behandelt mit alkal. Arsol. 1:800. 13 Tage später sind wieder Trypanosomen im Blute erschienen.

RR. mit Rasse „C" = negativ,
„ „ „ „D" = positiv.

Wiederum behandelt mit alkal. Arsolanlösung 1:800. Nach 20—22 Tagen sind abermals Trypanosomen im Blute nachgewiesen worden. † an der Infektion.

Maus Nr. 19, Gew. 18 g, bei viele/1 behandelt mit alkal. Arsolanlösung 1:800. Am 15. Tage nach der Behandlung reinfiziert mit 2 Tropfen Mäuseblut, welches viele/1 Tryp. enthielt (RR. scharf positiv). 5 Tage später sind Trypanosomen im Blute erschienen. Die Infektion verlief folgenderweise: 12. 1. = 1/65; 13. 1. = 1/150; 14. 1. = 1/75; 15. 1. = 1/10; 16. 1. = 8/1.

RR. mit Rasse „B" = negativ,
„ „ „ „C" = negativ.

Behandelt mit alkal. Arsol. 1:800; 21 Tage nach der Behandlung sind wieder Trypanosomen erschienen. Die RR. zeigte, wie es zu erwarten war, die Identität der neuen Trypanosomenrasse mit der Rasse „D", d. h. mit der Rasse, die zwei Rezidive mehr durchgemacht hatte als die Rasse „B", welche für die Reinfektion gedient hatte.

RR. mit Rasse „C" = negativ,
„ „ „ „D" [1]) = scharf positiv.

Aus dem Versuch entlassen.

Maus Nr. 20, Gew. 14 g, bei viele/1 behandelt mit alkal. Arsolanlösung 1:800. Am 16. Tage reinfiziert mit 4 Tropfen Mäuseblut, welches 3/1 Tryp. enthielt (RR. scharf positiv). 3 Tage später wurden Tryp. im Blute nachgewiesen.

RR. mit Rasse „B" = negativ,
„ „ „ „C" = scharf positiv.

Aus dem Versuch entlassen.

Maus Nr. 21, Gew. 12 g, bei viele/1 behandelt mit alkal. Arsolanlösung 1:800. Am 13. Tage nach der Behandlung reinfiziert mit 5 Tropfen Mäuseblut, welches 5—6/1 Tryp. enthielt (RR. scharf positiv). Am 5. Tage nach der Reinfektion sind Tryp. im Blute erschienen.

RR. mit Rasse „B" = negativ,
„ „ „ „C" = positiv.

Wiederum behandelt mit alkal. Arsolanlösung 1:800. 11 Tage später wurden Trypanosomen im Blute nachgewiesen. † an der Infektion.

Maus Nr. 22, Gew. 13 g, bei 7—8/1 behandelt mit alkal. Arsolanlösung 1:400. Am 11. Tage nach der Behandlung reinfiziert mit 4 Tropfen Mäuseblut,

---

1) Die Charakteristik der Rassen s. auf Seite 371.

welches 3/1 Tryp. enthielt. Am 7. Tage nach der Reinfektion sind Tryp. im Blute erschienen (2—3/1).

RR. mit Rasse „B“ = negativ,
„ „ „ „C“ = positiv.

Aus dem Versuch entlassen.

Maus Nr. 23, Gew. 13 g, bei 8—10/1 behandelt mit alkal. Arsolanlösung 1:400. Am 16. Tage nach der Behandlung reinfiziert mit 4 Tropfen Mäuseblut, welches 3/1 Tryp. enthielt (RR. scharf positiv). Am 7. Tage nach der Reinfektion sind Tryp. im Blute erschienen. Die Infektion verlief folgenderweise: 7. 5. = 1/40; 8. 5. = 1/2; 9. 5. = 3/25; 10. 5. = 1/2, am selben Tage:

RR. mit Rasse „B“ = negativ [1]),
„ „ „ „C“ = negativ [1])
„ „ „ „D“ = positiv [1]).

† an der Infektion.

Maus Nr. 24, Gew. 18 g, bei 5—6/1 behandelt mit alkal. Arsolanlösung 1:800. Am 29. Tage nach der Behandlung reinfiziert mit 9 Tropfen Mäuseblut, welches 1—2/1 Tryp. enthielt (RR. scharf positiv). Am 6. Tage nach der Reinfektion sind Tryp. im Blute erschienen (2/1).

RR. mit Rasse „B“ = negativ,
„ „ „ „C“ = scharf positiv.

Am selben Tage behandelt mit alkal. Arsolanlösung 1:800. Am 19. Tage nach der 2. Behandlung wieder Trypanosomen im Blute (10/1). Wiederum behandelt mit alkal. Arsolanlösung 1:800. 3 Tage später 3. Rezidiv. † an der Infektion.

Maus Nr. 25, Gew. 18 g, bei viele/1 behandelt mit Novoars. 1:800. Am 51. Tage nach der Behandlung reinfiziert mit 3 Tropfen Blut, welches 8/1 Tryp. enthielt (RR. scharf positiv). 5 Tage nach der Reinfektion sind Tryp. im Blute erschienen (1/1).

RR. mit Rasse „B“ = negativ,
„ „ „ „C“ = negativ.

† an der Infektion.

Maus Nr. 26, Gew. 16 g, bei viele/1 behandelt mit Novoars. 1:800. Am 23. Tage reinfiziert mit 5 Tropfen Blut, welches 2/5 Tryp. enthielt (RR. scharf positiv). Am 7. Tage nach der Reinfektion sind Tryp. im Blute erschienen (viele/1).

RR. mit Rasse „B“ = negativ,
„ „ „ „C“ = negativ.

† an der Infektion.

Maus Nr. 27, Gew. 12 g, bei viele/1 behandelt mit alkal. Ars. 1:800. Am 17. Tage nach der Behandlung reinfiziert mit 5 Tropfen Blut, welches 2/5 Tryp. enthielt (RR. scharf positiv). Am 4. Tage nach der Reinfektion sind Trypanosomen im Blute erschienen (1/2).

RR. mit Rasse „B“ = negativ,
„ „ „ „C“ = negativ.

† an der Infektion.

Maus Nr. 28, Gew. 13 g, bei 8/1 behandelt mit alkal. Ars. 1:800. Am 15. Tage nach der Behandlung reinfiziert mit 5 Tropfen Mäuseblut, welches 2/5 Tryp. enthielt. Am 7. Tage nach der Reinfektion sind Trypanosomen im Blute erschienen (5/1).

RR. mit Rasse „B“ = negativ,
„ „ „ „C“ = negativ.

† an der Infektion.

Maus Nr. 29, Gew. 15 g, infiziert mit einer salvarsanfesten Rasse „C“; bei 15/1 behandelt mit alkal. Ars. 1:800. Am 17. Tage reinfiziert mit 5 Tropfen Mäuseblut, welches 7/20 Trypanosomen (Rasse „C“) enthielt (RR. scharf positiv). Am 7. Tage nach der Reinfektion sind Tryp. im Blute erschienen (5/10).

RR. mit Rasse „C“ = negativ,
„ „ „ „D“ = negativ.

† an der Infektion.

Maus Nr. 30, Gew. 18 g, bei viele/1 behandelt mit Novoars. 1:800. Am 35. Tage nach der Behandlung reinfiziert mit 7 Tropfen Blut, welches 1—2/1 Tryp. enthielt (RR. scharf positiv). Am 6. Tage nach der Reinfektion sind Tryp. im Blute erschienen.

RR. mit Rasse „B“ = positiv, doch sind viele Trypanosomen frei geblieben.
„ „ „ „C“ = positiv, weniger freie Tryp., als im Versuch mit Rasse „B“.

† an der Infektion.

---

1) Die Charakteristik der Rassen s. auf S. 371.

Maus Nr. 31, Gew. 14 g, bei 6—7/1 behandelt mit alkal. Ars. 1:1500. Am 46. Tage nach der Behandlung reinfiziert mit 3 Tropfen Blut, welches 8/1 Tryp. enthielt (RR. negativ). Am 5. Tage nach der Reinfektion sind Tryp. im Blute erschienen (5/1).
RR. mit Rasse „B" = scharf positiv, nur vereinzelte Trypanosomen sind frei geblieben.
„ „ „ „C" = negativ.
† an der Infektion.

Maus Nr. 32, Gew. 15 g, bei viele/1 behandelt mit alkal. Ars. 1:800. Am 42. Tage reinfiziert mit 3 Tropfen Blut, welches 8/1 Tryp. enthielt (RR. negativ). Am 6. Tage nach der Reinfektion sind Trypanosomen im Blute erschienen (15—20/1).
RR. mit Rasse „B" = positiv, nur vereinzelte Trypanosomen sind frei,
„ „ „ „C" = negativ.

Maus Nr. 33, Gew. 13 g, bei viele/1 behandelt mit alkal. Ars. 1:1000. Am 35. Tage nach der Behandlung reinfiziert mit 3 Tropfen Mäuseblut, welches 8/1 Tryp. enthielt (RR. scharf positiv). Am 5. Tage nach der Reinfektion sind Tryp. im Blute erschienen (1—2/1).
RR. mit Rasse „B" = schwach positiv,
„ „ „ „C" = negativ.
† an der Infektion.

Maus Nr. 34, Gew. 19 g, bei 15/1 behandelt mit alkal. Ars. 1:800. Am 20. Tage nach der Behandlung reinfiziert mit 3 Tropfen Mäuseblut, welches 8/1 Tryp. enthielt (RR. scharf positiv). Am 5. Tage nach der Infektion sind Tryp. im Blute erschienen (1—2/1).
RR. mit Rasse „B" = schwach positiv (nur vereinzelte Trypanosomen beladen),
„ „ „ „C" = negativ.
† an der Infektion.

Literatur.

1) Rieckenberg, Ztschr. f. Immunitätsf. Bd. 26. 1917. — 2) Brussin u. Beletzky, Journ. f. Mikrob., Pathol. und Infektionskrankh. 1924. (Russisch.) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 96. 1925. — 3) Kritschewsky u. Awtonomow, Ztschr. f. Immunitätsf. Bd. 42. 1925. — 4) Schilling, Kolle u. Wassermann. Bd. 7. — 5) Ehrlich, Berl. klin. Woch. 1907. — 6) Ders., Münch. med. Woch. 1909. Nr. 5.

Ein Mörser zur sterilen Zerkleinerung.

[Aus der Bakteriologischen Abteilung (bakteriologisches Laboratorium) des Reichs-Gesundheitsamtes.]

Von **Kurt Herzberg.**

Mit 1 Abbildung im Text.

Die tierexperimentelle Laboratoriumsarbeit erfordert häufig die Zerkleinerung von Organen, z. B. des Gehirns, der Leber, Milz usw. und nachträglich ihre sterile Aufbewahrung. Die Sterilität kann meist erreicht werden, wenn man nach dem Mörsern das Organ in 60—80proz. Glyzerinwasser aufbewahrt. Hier vertraut man also darauf, daß die während der Zerkleinerung im gewöhnlichen Porzellan- oder Achatmörser aus der Luft oder von der Hand in den Organbrei gelangenden Keime später durch das Glyzerin abgetötet werden. Es gibt aber oft genug Versuchsbedingungen, die entweder ein unmittelbar nach dem Mörsern steriles Material verlangen oder die den Zusatz eines Konservierungsmittels bei späteren Versuchen unerwünscht erscheinen lassen.

Weiterverimpfungen von Tier zu Tier und Züchtung von Organparasiten sind hier Beispiele. Bei seinen Arbeiten zur Züchtung des Fleckfiebererregers behalf sich Kuczynski so, daß er sich zur Zermörserung des Meerschweinchengehirns wie zu einer Operation wusch und desinfizierte und über den Mörser eine große sterile Glasschale halten ließ. Dieses Vorgehen befriedigt bei Zerkleinerungen, die nur 1—2 Min. in Anspruch nehmen, wenn es auch keine absolute Gewähr für Sterilität bietet. Von den Arbeiten am offenen Mörser ist die Vorschrift von Kuczynski wohl diejenige, die einer Luftinfektion am wahrscheinlichsten vorbeugt. Mit Sicherheit kann sie nur bei geschlossenen Apparaturen abgewendet werden.

Man verfügt hier über über 2 Formen. Zunächst gelingt die sterile Organzerkleinerung in dem Apparat nach Latapie, der aber wegen seiner Kostspieligkeit nur in wenigen Instituten vorhanden sein dürfte. Ihn benutzte Mislowitzer bei seinen Untersuchungen über die aseptische Autolyse der Leber. Weiterhin gibt es unter den Mörsern Typen, bei denen ein Abschluß von der Außenluft und damit Sterilität durch eine vom Mörserrand zum Pistill verlaufende Leder- oder Gummimanschette erreicht werden kann. An diesen bisher verfügbaren Modellen findet man zwei Nachteile. Allen Typen fehlt eine verschließbare Oeffnung, die jederzeit während des Mörserns ein steriles Zufügen von Organmaterial oder Verdünnungsflüssigkeit resp. die gefahrlose Entnahme des Breies nach beendeter Zerkleinerung gestattet. Auch bei dem neuerdings von Kovács (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 95. S. 89) beschriebenen Apparat ist zur Materialeinführung und -Entnahme die Freilegung der Reibschale erforderlich. Sodann sind mit Ausnahme von zwei Mörsern, denen man zum Lichteinfall einen Glasaufsatz gab, die übrigen derart konstruiert, daß kein Licht in die Reibschale dringt. Man arbeitet hier also im Dunkeln und erhält von dem Grad der Zerkleinerung während des Mörserns kein Bild.



Fig. 1.

Diese Nachteile sollen durch das in Fig. 1 abgebildete Modell vermieden werden, welches von der Firma P. Altmann, Berlin NW 6, Luisenstr. 47, nach meinen Angaben hergestellt worden ist.

Der Mörser besteht aus 4 Teilen. Porzellan-Reibschale, vernickeltem Metallaufsatz, Gummimanschette einschließlich 2 Gummiringen und

Glaspistill. Die derzeit vorrätige Porzellan-Reibschale hat einen inneren Durchmesser von 10 cm und eine Tiefe von 5 cm, doch steht einer Anfertigung größerer oder kleinerer Schalen mit entsprechenden Aufsätzen keine Schwierigkeiten entgegen. Je nach Bedarf wird die Schale mit rauher oder glasierter Innenfläche (zur Vermeidung von Adsorptionen bei Infektionsstoffen wie Pocken, Herpes) geliefert. Der Metallaufsatz hat die Gestalt eines stumpfen Kegels und besitzt in seinem Mantel 2 einander gegenüber liegende Oeffnungen von je 3,8 cm Durchmesser. Die eine Oeffnung dient für den Lichteinfall und zeigt Bajonettverschluß mit Glasscheibe und Gummidichtung, die zweite Oeffnung ist zum Einblicken, zur Einführung und Entnahme des Materials bestimmt (Schraubverschluß mit Glasscheibe und Gummidichtung). Die Verbindung vom Metallaufsatz zum Pistill wird durch eine Gummimanschette bewirkt, die am Aufsatz und Pistill durch je einen Gummiring festgehalten wird. Das Pistill ist 22 cm lang und trägt für den Sitz des Gummiringes eine Einkerbung. Um eine größere Helligkeit im Innern des Mörsers zu erzielen wurde das Pistill aus Glas gewählt.

Der Mörser wird zum sterilen Arbeiten komplett im Dampftopf erhitzt. Wasserdampfkondensationen bei der Abkühlung werden an den Glasscheiben durch einen Fetthauch vermieden, Wasseransammlungen in der Reibschale durch eine sterile Pipette entfernt. Der Mörser gestattet sterile Einführung, Zerkleinerung und Entnahme steril eingeführten Materials. Wir benutzen ihn besonders für Organzerkleinerungen. Außerdem kann er für bakteriologische Laboratorien zum Zerreiben von Tb.-, Typhus- u. a. Bazillen Verwendung finden. Von der Arzneimittelbereitung ist er mit Vorteil bei solchen Substanzen zu benutzen, die leicht in Staubform übergehen und ebenfalls gesundheitsschädigend wirken (Chrysarobin, Veratrin, Cortex Quillaiae etc.)

Inhalt.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena — 5378.

Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Originale. Bd. 96. Heft 7/8.

Ausgegeben am 25. November 1925.

Die Natur des Bakteriophagen.

[Aus dem Zentrallaboratorium des Aegyptischen internationalen Sanitätsamts, Alexandrien.]

Von **F. d'Herelle.**

1. Das Problem.

Seit 5 Jahren ist eine Diskussion über die Natur des Bakteriophagenprinzips im Gange. Mehrere deutsche Forscher, unter anderen Dörr, Otto, Gildemeister, Seiffert haben in ebenso lebhafter wie höflicher Weise die Hypothese von der Lebewesennatur dieses Prinzips bekämpft, welche ich von Anfang an aufgestellt hatte (1). Andere, wie Prausnitz, Reichert, Meißner haben dagegen meinen Standpunkt vertreten, und Prausnitz hat sogar zugunsten meiner Theorie Beweisgründe von beträchtlicher Wichtigkeit angeführt.

Alle Einwände, die der Lebewesennatur des Bakteriophagen entgegengehalten wurden, stützten sich auf indirekte Beweisgründe, die keine entscheidende Beweiskraft haben können. Mit ihrer Hilfe allein läßt sich diese Frage nicht lösen. Alles, was man von einem indirekten Beweisgrund sagen kann, ist, daß er besser zu dieser oder jener Hypothese paßt, ohne daß aber deswegen die gegenteiligen Hypothesen, die weniger gut zu ihm passen, widerlegt oder ausgeschaltet werden. Das haben übrigens auch die Autoren zugegeben, die diese Einwände gemacht haben.

So können beispielsweise weder der Ort, an dem man ein Wesen finden kann, noch die Umstände, unter denen dies geschieht, die Frage über sein Wesen entscheiden.

Wenn man in der Natur Bakterienstämme findet, die das Bakteriophagenprinzip innehalten, wenn man dieses Etwas im Blute, in der Bauchhöhlenflüssigkeit, im Abszeßeiter mancher Kranken wiederfindet, ist dies ein Beweisgrund dafür, daß es nicht lebt? Besteht eine Unverträglichkeit zwischen diesen Tatsachen und seiner Lebewesennatur?

Die Frage läßt sich nicht auf Grund indirekter Beweisgründe entscheiden; es heißt hier, direkte Argumente herbeizuschaffen, die sich auf unbestreitbare experimentelle Tatsachen stützen, denn solche Beweisgründe haben einen absoluten Wert, d. h. sie lassen nur Raum für eine einzige Hypothese und weisen alle übrigen zurück.

Vor mehr als einem Jahre schrieb ich eine Arbeit über die Lebensnatur des Bakteriophagen, die sich auf direkte Beweisgründe stützte; sie ist in französischen und holländischen Zeitschriften veröffentlicht worden (2, 3). Von den französischen Autoren, die eine gegenteilige Ansicht vertreten, hat niemand sie besprochen, oder auch nur eine Anspielung auf sie gemacht. Ich darf wohl daraus schließen, daß sie der Meinung waren, eine solche Diskussion sei unmöglich. Von den holländischen Autoren brauche ich nicht zu sprechen, da alle Anhänger der Lebewesentheorie sind. Da die Zeitschriften, in denen diese Arbeit veröffentlicht wurde, in Deutschland wenig gelesen werden, möchte ich sie hier wiedergeben, nachdem sie durch verschiedene sicher gewonnene Erfahrungen vervollständigt ist.

Wir wollen zunächst darauf hinweisen, daß ein Wesen nicht gesehen zu werden braucht, um die Bestimmung seiner Natur zu ermöglichen Man kann sogar kühnlich behaupten, daß vom objektiven Standpunkt aus das Auge einen trügerischen Sinn darstellt, und daß eine Wissenschaft erst von dem Tage an wirklich Fortschritte macht, an dem sie sich vom Zwange des Gesichtseindrucks freimacht. Das alte Beispiel der Astronomie, aus neuer Zeit das der Physik beweisen dies. Unter allen biologischen Wissenschaftszweigen ist die Physiologie sicher derjenige, der sich am wenigsten auf den Gesichtssinn stützt, sie sieht von der Form ab, studiert nur die Zusammenhänge, die Funktionen; sie aber hat den größten Fortschritt gemacht.

Gerade diese Wissenschaft der Funktionen, die Physiologie, heißt es aber zu Rate zu ziehen, wenn es gilt, die Natur eines Wesens zu bestimmen, denn das Auge ist ohnmächtig, wenn die Frage entschieden werden soll, ob ein Wesen tot oder lebend ist, ob es Leben besitzt oder dieses ihm fehlt.

2. Das bakteriophage Körperchen.

Obgleich es a priori keinen gültigen Beweis gibt, der besagt, daß ein löslicher Körper nicht mit Leben begabt sein kann, wovon Beijerinck hat überzeugen wollen, ist es doch wahr, daß bis heute alle als lebend erkannten Wesen in einer diskontinuierlichen Form in der Flüssigkeit vorkommen, die sie beherbergt. Kommt nun der Bakteriophage in einer solchen „unlöslichen" Form vor?

Der folgende Versuch (4) ist zu wiederholten Malen mit ganz ähnlichen Ergebnissen mit verschiedenen Arten des Bakteriophagen angestellt worden, die gegen B. dysenteriae und Staphylococcus aureus und albus wirksam waren. Er entscheidet die Frage zugunsten der Diskontinuität.

1. Ich nehme einen Shiga-Bakteriophagen, d. h. eine Aufschwemmung von Shiga-Kruse-Keimen, die 250 Millionen Bazillen in einem Kubikzentimeter enthielt und die unter der Wirkung des Bakteriophagen eine vollständige und andauernde Lyse durchgemacht hat[1]).

1) Der Versuch ist nur dann überzeugend, wenn der verwendete Bakteriophage sehr wirksam ist, d. h. wenn er eine vollkommene und fortdauernde Auflösung einer Bakteriophagenaufschwemmung bewirkt, die 250 Millionen Keime im Kubikzentimeter enthält. Bei Verwendung von Bakteriophagen mit geringer Wirksamkeit verdeckt die „sekundäre Kultur", die dann immer auftritt, die lytische Wirkung. Bemerkenswert ist, daß bei Benutzung eines starken Bakteriophagen ein Filtrieren nach der Lyse nicht nötig ist, da es hierbei nicht zur Bildung von sekundären Kulturen kommt.

Von dieser Bakteriophagenaufschwemmung stelle ich eine fallende Reihe von Verdünnungen her, deren Keimgehalt jeweils um das Zehnfache abnimmt. Ich habe dann eine Reihe von Röhrchen benutzt, deren jedes in 1 ccm Bouillon folgende in Kubikzentimetern ausgedrückte Mengen des Bakteriophagenprinzips enthielt: $1 \cdot 10^{-1}$, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}, 10^{-11}, 10^{-12}.

Dann beimpfe ich alle diese Röhrchen mit je 1 Tropfen einer dicken Aufschwemmung von frischen Shiga-Kruse-Keimen in der Weise, daß eine schwache, aber deutliche Trübung zustande kommt.

Nach 48stünd. Aufbewahrung im Brutschrank stelle ich fest, daß alle diese Aufschwemmungen von $1 \cdot 10^{-1}$ bis $1 \cdot 10^{-10}$ klar, die letzten beiden aber trübe sind. Wiederholte Kontrollen zeigen, daß diese beiden letzten keine Spur von dem Bakteriophagen enthalten.

2. Ich nehme wiederum das gleiche Bakteriophagenlysat und stelle davon eine Reihe von Verdünnungen bis $1 \cdot 10^{-9}$ her, d. h. bis zur vorletzten der gerade noch wirksamen Verdünnungen.

Ich verteile die 10 ccm der Verdünnung $1 \cdot 10^{-9}$ gleichmäßig, also je 1 ccm, auf die 10 Röhrchen, deren jedes eine ganz leicht getrübte Aufschwemmung von Shiga-Kruse-Bazillen enthält.

Nach einem gewissen Zeitraum stelle ich fest, daß 3 dieser Aufschwemmungen klar sind, die 7 anderen aber trübe. Wiederholte Prüfungen ergeben, daß diese 7 Kulturen keinen Bakteriophagen enthalten[1]).

Diese Erfahrungen liefern den Beweis, daß der Bakteriophage in einer diskontinuierlichen Form vorkommt, d. h. daß er aus Körperchen besteht.

Ich habe ebenfalls gezeigt (5), daß das bakteriophage Körperchen die Kolloidmembranen durchdringt, die für die Eiweißmoleküle durchlässig sind und von denen zurückgehalten wird, die auch jene Moleküle nicht durchlassen.

Prausnitz (6), der den Durchschnitt des Bakteriophagenkörperchens durch Vergleiche mit den Kolloiden bestimmt hat, deren Teilchenmaße bekannt sind, hat ihn gleichmäßig als ungefähr 20 $\mu\mu$ groß gefunden, v. Angerer aber mit einer anderen Methode die naheliegende Zahl von 30 $\mu\mu$.

Andererseits hat Levaditi (8) gesehen, daß die Ultravirusarten der Vakzine, der Tollwut, des Herpes die gleiche Ausdehnung besaßen wie der Bakteriophage, denn wenn eines von ihnen Kolloidmembranen passierte, vermochten es alle, wurde eines zurückgehalten, geschah mit allen das gleiche.

Der Bakteriophage besteht also aus Körperteilchen, die einen Durchmesser von 20—30 $\mu\mu$ besitzen[2]).

3. Das „Kriterium" des Lebens.

Was ist die Natur dieses Körperchens? Um das zu erfahren, genügt es, die folgenden Fragen zu beantworten:

Gibt es ein Zusammenwirken von Funktionen, das uns zu erkennen erlaubt, ob ein Wesen lebend oder unbelebt ist, je nachdem es diese Gemeinschaft besitzt oder nicht?

---

1) Das ist der Fall mit dem bakteriologischen Lysat, das für diesen Versuch verwendet wurde. Bei andern Lysaten braucht diese Verdünnung nur $1-10^{-8}$ oder $1 \cdot 10^{-7}$ zu betragen, manchmal aber ist sie auch 10^{-11}, welches die stärkste noch wirksame Verdünnung ist. Die schwächere Wirksamkeit eines Lysats macht aber gar nichts aus, es genügt dann für den 2. Teil des Versuchs, mit der vorletzten der dann noch wirksamen Verdünnungen zu arbeiten.

2) d. h. also einen ungefähr 10mal kleineren Durchmesser, als der der kleinsten bisher bekannten Bakterien.

Lautet die Antwort auf diese erste Frage bejahend, erhebt sich die zweite Frage: besitzt der Bakteriophage diese Gemeinschaft von Fähigkeiten?

Wenn der Bakteriophage dieses Kriterium des Lebens nicht besitzt, oder wenn es uns gegenwärtig unmöglich ist, es zu zeigen, ermächtigt uns nichts, ihn als lebendes Wesen anzusprechen, und das Problem ist augenblicklich unlösbar. Läßt sich aber der Beweis erbringen, daß er es besitzt, so ist der Bakteriophage eben auf Grund dieser Definition lebend, und kein Beweisgrund kann zu dem Schlusse führen, daß ein Wesen, das das Kriterium des Lebens besitzt, nicht lebend sei.

1. Frage: Gibt es ein Kriterium des Lebens und welches ist es? Diese Frage läßt sich mit anderen Worten so ausdrücken: Woran erkennen wir, daß ein Wesen lebend sei.

Wir wissen nicht, was das Leben ist, und zwar weil wir noch nicht jenes besondere physikalisch-chemische Vermögen haben erkennen können, das der Materie die Eigenschaft des Lebens verleiht. Wenn wir aber auch noch nicht das Wesen des Lebens erkennen, so wissen wir doch, was ihm zukommt: es ist die Verbindung zweier Grundfähigkeiten, des Vermögens der echten Assimilation oder Assimilation im heterogenen Milieu und des Adaptationsvermögens. Wir nennen alle jene Wesen lebend, die die Gemeinschaft dieser Fähigkeiten besitzen; unbelebt diejenigen, die sie nicht besitzen.

Prüfen wir rasch, welches die Kennzeichen jeder der beiden Faktoren dieser Gemeinschaft sind und welche Folgen sich daraus ergeben.

Wird z. B. ein Kupfersulfatkristall in eine konzentrierte Kupfersulfatlösung gebracht, so nimmt er an Umfang zu, er verleibt sich die Kupfersulfatmoleküle ein, die in der Flüssigkeit enthalten sind. Besitzt er das Vermögen der Assimilation? Ja! aber diese Assimilation geht nur im homogenen Milieu vor sich. Die Assimilation im heterogenen Milieu ist ganz anderer Natur; dabei findet chemische Arbeit statt, ein Umbau von Substanz: das Wesen, das diese Fähigkeit besitzt, wandelt die in der Umgebung vorhandenen Stoffe, die anders als seine Eigensubstanz sind, in solche um, die denen gleichen, aus denen es selbst besteht. Wird ein Mikrobe in Nährbouillon gebracht, so wandelt er „Bouillonsubstanz" in „Mikrobensubstanz" um.

Der Kristall besitzt das Vermögen der Assimilation im homogenen Milieu, das Kleinlebewesen das Vermögen der Assimilation im heterogenen Milieu, der Kristall ist unbelebt, der Mikrobe lebt.

Das Vermögen der Assimilation im heterogenen Milieu bedingt die Fähigkeit der Vermehrung, mag es sich übrigens um Assimilation im homogenen oder heterogenen Milieu handeln. Was die Wesen angeht, die diese letzte Fähigkeit besitzen, so würde die Grundmasse eines dieser Wesen, wenn man es in eine Umgebung brächte, die assimilierbare Stoffe enthält, bestrebt sein, sich unaufhörlich zu vergrößern, und zwar bis zur Erschöpfung dieser Stoffe (abgesehen von jedem dies einschränkenden Sekundärprozeß, wie z. B. der Anhäufung von Abfallsprodukten). Aber bei allen Wesen, denen diese Fähigkeit zukommt, ist das Elementarteilchen polarisiert, und sein Größenumfang wird eben wegen dieser Tatsache durch eine physikalische Erscheinung begrenzt, die Perrin folgendermaßen hervorhebt: „Wenn man", so sagt er, „zugibt, daß die Ladungen der Teilchen von den positiven H-Ionen und negativen OH-Ionen abhängen, die in der Flüssigkeit verteilt sind, und sich ihnen anlagern, kann man beobachten, daß, wenn das Teilchen eine

gewisse Größe erlangt hat und die Zahl der freien Ionen groß genug ist, daß es mehrere anlagern kann, es in sich selbst die Ursache des Auseinanderfallens trägt, die die Zweiteilung herbeiführen kann".

Das Vermehrungsvermögen ist keine Grundeigenschaft der lebenden Materie, sie ist nur ein Begleitumstand des Assimilationsvermögens, das einem polarisierten Teilchen zukommt.

Zu der grundlegenden Eigenart, die der Materie im lebenden Zustande zukommt, gehört eine zweite Fähigkeit, denn wir finden sie immer wieder mit der Assimilation in jedem lebenden Protoplasma vergesellschaftet; es ist das Adaptationsvermögen. Es gibt keine Assimilation ohne Adaptation, keine Adaptation ohne Assimilation. Dies Vermögen besteht in der Fähigkeit, den jeweiligen Bedingungen eine spezifische Reaktion entgegenzusetzen. Unter spezifischer Reaktion haben wir eine Reizantwort zu verstehen, die auf einen einwirkenden Reiz abgestimmt ist.

In jedem lebenden Protoplasma findet sich neben dem Anpassungsvermögen eine zweite Erscheinung; es bewahrt die Erinnerung an eine geleistete Reizantwort, die sich gewissermaßen in seine Substanz eingräbt. Man braucht hier allerdings nicht dem Wort „Erinnerung" den Begriff des Seelischen beizulegen, es bedeutet einfach, daß ein Wesen, das einmal, auf einen gegebenen Reiz in spezifischer Weise geantwortet hat, schneller und im allgemeinen auch heftiger einen zweiten Reiz gleicher Art beantwortet. Die Erinnerung ist ja gleichfalls spezifisch, denn sie hat keinen Einfluß auf eine Antwort, die auf einen Reiz anderer Art erfolgt. Diese Reaktionserinnerung vererbt sich[1]), aber wenn die Wiederholung eines Reizes gleicher Art lange auf sich warten läßt, verliert sich allmählich die Erinnerung an die dazugehörige Antwort.

Aber ein Lebewesen reagiert unaufhörlich: die Bedingungen der Umwelt, in der es lebt, wechseln in jedem Augenblick und in der verschiedensten Weise, die spezifischen Reaktionen, deren es sich bedient, um sich an diese Bedingungen zu gewöhnen, sind unzählbar; die Erinnerung an eine jede Reizantwort prägt sich der Substanz mehr oder weniger stark ein, je nach dem Kräfteaufwand der einzelnen Reaktionen, jede dieser „Erinnerungen" wird auf die Nachkommen übertragen. Da die Bedingungen für jedes Wesen der gleichen Gattung verschieden sind, besitzt jedes Wesen besondere Kennzeichen und Angewohnheiten, seien sie nun ererbter oder erworbener Art. Schon zu Beginn der Bakteriologie hatte Pasteur festgestellt, daß in der gleichen Kultur jeder Mikrobe neben gleichen Kennzeichen, die der Gattung zukommen, besondere Zeichen aufweist.

Wir hatten gesehen, daß das Assimilationsvermögen die Vermehrung zur Folge hat, das Anpassungsvermögen bringt die Veränderlichkeit lebender Wesen mit sich, die zu derselben Gattung gehören.

Solcher Art ist die Gemeinschaft der Grundfähigkeiten der lebenden Materie. Stellt diese Gemeinschaft das „Kriterium" des Lebens dar? Wir können in bejahendem Sinne antworten, denn alle lebenden

1) Ich habe hier nicht die Uebertragung von Eigenschaften auf Nachkommen durch Vermittlung von Keimzellen im Auge, ein Fall, der wohl auch noch recht dunkel ist. Die einzige Uebertragung von Eigenschaften, die uns hier interessiert, ist die, welche von der mütterlichen Zelle auf die Tochterzelle erfolgt, die aus ihr durch Zweiteilung entstehen. Hier ist die Uebertragung erworbener Eigenschaften außer Zweifel: alle Immunität beweist dies, ebenso wie alle Erscheinungen der Gewöhnung, die sich leicht experimentell bei den Bakterien erzeugen lassen.

Wesen besitzen diese Gemeinschaft von Kennzeichen, aber keines der als unbelebt bezeichneten besitzt sie. Wenn ein Wesen, das wir als lebend betrachten, unter Bedingungen, die geeignet sind, den Gebrauch dieser Fähigkeiten zu verlangen, von ihnen keinen Gebrauch macht, sprechen wir ihm die Gemeinschaft des Lebens ab; wir sagen dann, es ist tot.

Wenn man sich weigert, diese Schlußfolgerungen anzuerkennen, wird jede Diskussion über die Natur irgend eines Wesens gegenstandslos; es handelt sich dann um nicht mehr als um einen Wortstreit ohne jegliche philosophische Bedeutung; man gerät in eine Sackgasse. Es bliebe dann nichts anderes übrig, als jede Erörterung mit der Erklärung abzuschließen, daß die Erkenntnis der Natur irgend eines Lebewesens zu den Unmöglichkeiten gehört. Sagte man dies, so dächte man wohl nicht daran, daß kein Gelehrter der Welt eine solche Ungereimtheit verfechten würde.

Es bleibt uns also übrig, den Beweis zu liefern, daß das Bakteriophagenkörperchen die Gemeinschaft der Fähigkeiten besitzt, die das Kriterium des Lebens ausmachen.

4. Selbständigkeit.

Wenn ein Wesen, dessen Natur es zu bestimmen gilt, makroskopisch oder mikroskopisch sichtbar ist, besteht im allgemeinen keine Schwierigkeit, zu entscheiden, ob es das Vermögen der Assimilation im heterogenen Milieu besitzt. Ein Mikrobe vermehrt sich im Körper eines Tieres oder in der Bouillon, daraus schließen wir, daß es tierische Substanz oder Nährstoffe der Kulturflüssigkeit in „Mikrobensubstanz“ umgewandelt hat; also besitzt es das Vermögen der Assimilation im heterogenen Milieu.

Wenn aber das Wesen, dessen Natur bestimmt werden soll, wegen seiner Kleinheit nicht sichtbar ist, ist es dann unmöglich, zu erfahren, ob es dies Vermögen besitzt? Keineswegs, denn in keinem Falle sehen wir wir die Assimilation; wir nehmen ihr Vorhandensein an, weil das fragliche Wesen sich vermehrt unter Benutzung eines fremden Stoffes, um daraus einen wesenseigenen Stoff herzustellen.

Das bakteriophage Körperchen vermehrt sich auf Kosten der Bakteriensubstanz, wie alle Forscher zugeben, und wenn es sichtbar wäre, würde niemand bestreiten, daß es assimiliert. Aber im Falle des Bakteriophagen, der übrigens gleichbedeutend mit dem aller Ultravirusarten ist, wendet man ein, daß die Bakteriophagenkörperchensubstanz aus der Bakteriensubstanz bestehen könnte. Es würde sich dann einfach um Assimilation im homogenen Milieu handeln, wie das beim Kristall der Fall ist, der sich in einer konzentrierten Lösung vermehrt. Um zu beweisen, daß der Bakteriophage das Vermögen der Assimilation im fremden Milieu besitzt, muß man zu allererst beweisen, daß die „Bakteriophagensubstanz“ eine andere Beschaffenheit hat als die „Bakteriensubstanz“, d. h. es muß der Beweis erbracht werden, daß der Bakteriophage ein selbständiges Wesen ist, das unabhängig von dem Bakterium ist, das seiner Wirkung ausgesetzt ist.

Die Beweise für die Selbständigkeit des bakteriophagen Körperchens sind ebenso vielseitig wie zahlreich.

I. Zu Beginn meiner Forschungen züchtete ich mehrere Hunderte von Shiga-Bakteriophagen aus den Fäzes normaler Menschen und

solcher, die Ruhr oder andere Krankheiten durchgemacht hatten, aus den Ausscheidungen verschiedener Tiere, wie Pferd, Schwein, Rind, Hund, Katze, Huhn, Ente, Gans usw., aus Flußwasser, aus Kloaken, aus dem Meer. Ich habe nicht 2 solcher Bakteriophagen gefunden, die in bezug auf ihr Angriffsvermögen und die Stärke dieses Vermögens gegenüber verschiedenen Arten der Coli-Typhus-Dysenterie-Gruppe vollkommen gleich gewesen wären (9). Nun hatte ich im Verlauf aller dieser Untersuchungen zu den Passagen, die bestimmt waren, die Wirksamkeit dieser Bakteriophagen zu steigern, stets den gleichen Stamm des Shiga-Kruse-Stammes benutzt. Es ist demnach einleuchtend, daß, wenn der Bakteriophage ein Erzeugnis der Bakterien ist, alle diese Bakteriophagen hätten gleichartig sein, hätten genau dieselben gleichen Fähigkeiten aufweisen müssen, da sie alle von der gleichen Bakteriensubstanz abstammten. In dem Augenblick, wo das nicht der Fall ist, besitzt jeder Bakteriophage eine besondere Wesensart für sich, die unabhängig von dem Bakterium ist, auf dessen Kosten er sich vermehrt hat. Er ist also selbständig.

II. Alle Autoren geben zu, daß das Bakterium die Fähigkeit besitzt, ein Widerstandsvermögen gegenüber dem Bakteriophagen zu erwerben (10). Es handelt sich um eine echte Immunität, die auf die Nachkommen bei Abwesenheit jedes Bakteriophagen über eine gewisse Zahl von Generationen hinaus übertragbar ist. Diese erworbene Immunität verringert sich allmählich bei Abwesenheit des Bakteriophagen nach 20 oder 30 Ueberimpfungen. Das Bakterium ist wieder ebenso empfindlich geworden, wie es vor dem Erwerb dieser Immunität war (11). Das läßt sich nur so verstehen, daß der Bakteriophage ein selbständiges Wesen ist, das unabhängig vom Bakterium ist.

III. Man findet manchmal[1]) in der Natur „lysogene" Bakterienstämme, aus denen man ein bakteriophages Prinzip isolieren kann (12, 13). Man kann solche Kulturen auch experimentell erlangen. Um solche Kulturen zu „reinigen", seien sie nun natürlich gefunden oder experimentell erzeugt, genügt es, Isolierungen der Bakterien auf Agar, besser noch auf Gelatine, als Einzelkolonien herzustellen (14, 15). Oft erhält man von der ersten Isolierung an, immer aber nach der dritten oder vierten, Kolonien, die frei von jedem lytischen Prinzip sind. Die bakteriophagen Körperchen verhalten sich also wie eine „Verunreinigung", die eine Bakterienkultur verseuchen kann. Wie sollte man wohl eine Bakterienkultur endgültig von einem Produkt reinigen können, das von den Bakterien selbst herstammt, und zwar durch die gewöhnliche Technik der Isolierung von Kolonien? Das bakteriophage Körperchen ist also dem Bakterium fremd, es ist selbständig.

1) Die Versicherung, daß es möglich sei, aus jeder Bakterienkultur ein bakteriolytisches Prinzip zu gewinnen, kann nur stammen aus einer Vermengung der Erscheinung der Bakteriophagie mit gewissen Erscheinungen der Autolyse und Wachstumsbehinderung in Kulturen, die jedoch Wesenszüge darbieten, die vollkommen von jenen unterschieden sind, die die Bakteriophagie kennzeichnen. Bakterienkulturen, die mit dem Bakteriophagen vergesellschaftet sind, sind selten, und es ist immer möglich, sie zu reinigen (siehe unter anderem: d'Herelle, 29—30, und die zahlreichen systematischen Versuche von Flu, 31—32). Ich glaube, es ist Büchner, der sagt, daß, wenn sich Widersprüche zwischen 2 Forschern ergeben, das daher komme, daß sie verschiedene Erscheinungen studierten. Ich glaube nicht, daß diese Bemerkung jemals eine bessere Bestätigung erlangt hat, als durch all das, was die Untersuchungen über die Bakteriophagie angeht.

IV. Bekanntlich stellt der Typhus-Bazillus eine Bakterienart dar, die in bezug auf den Bakteriophagen nicht gleichmäßig ist (14), d. h. von verschiedenen Stämmen dieses Bazillus werden nicht alle durch die gleiche Bakteriophagenart angegriffen. Jede Typhusbakteriophagenart besitzt eine Affinität zu einer gewissen Anzahl von Typhus-Stämmen und bleibt gegenüber anderen vollkommen wirkungslos. Es handelt sich dabei nicht um eine erworbene Widerstandsfähigkeit, denn ein jedes solches von diesem Bakterium gegenüber einem Bakteriophagen gewonnene Widerstandsvermögen verliert sich allmählich in dessen Abwesenheit, sondern um eine natürliche Resistenz. Die Mehrzahl der Stämme, die durch eine Bakteriophagenart nicht angegriffen werden, werden es durch andere.

Janzen und Wolff (16) haben sich dieser Besonderheit bedient, um die Selbständigkeit des Bakteriophagen gegenüber dem Bakterium zu beweisen. Ihre Versuche lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Von 2 Typhus-Bakteriophagenarten Wi und Sm greift jeder eine gewisse Anzahl von Typhusstämmen an; von diesen letzteren wird der eine, Sm, gleichzeitig von beiden Bakteriophagen angegriffen. Sie legen nun eine Reihe von Passagen des Bakteriophagen Wi mit dem Typhusstamme Sm an, ebenso eine solche des Bakteriophagen Sm mit demselben Stamme Sm. Sie beobachteten, daß nach diesen Passagenreihen jeder der beiden Bakteriophagen seine besondere Eigenschaft bewahrt hat.

Beide Bakteriophagen besaßen seit ihrer Isolierung aus den Ausscheidungen von Typhusrekonvaleszenten gegenüber einer gewissen Anzahl von Typhus-Stämmen Angriffseigenschaften, die bei beiden Bakteriophagen verschieden waren. Es ist sicher, daß, wenn der Bakteriophage ein Bakterienprodukt wäre, beide Bakteriophagen gleichförmig geworden wären, da sich alle beide in den Reihen auf Kosten des Bazillenstammes vermehrten. Da der Versuch zeigt, daß das nicht der Fall ist, haben Janzen und Wolff gefolgert, daß der Bakteriophage in bezug auf das Bakterium, das seiner Tätigkeit unterliegt, selbständig ist[1]).

V. Mein Landsmann Maitland führt in Toronto (18) einen Versuch aus, der gerade umgekehrt wie der von Janzen und Wolff ist, d. h. er isoliert einen Bakteriophagen, der gleichzeitig gegen Paratyphus B und den Ruhrbazillus wirksam war, und läßt ihn in einer Reihe von Passagen einmal auf Kosten des Paratyphus-, zum andern auf Kosten des Shiga-Kruse-Bazillus vermehren. Er stellt fest, daß der Bakteriophage gleich bleibt, gleichgültig ob er sich auf Kosten des einen oder des anderen vermehrt hat.

Maitland weist gerade darauf hin, daß, wenn die Vermehrung des bakteriophagen Prinzips das Ergebnis des Bakterienstoffwechsels wäre, von dem Augenblicke an, wo man die Vermehrung desselben Prinzips auf Kosten von Bakterien, die verschiedenen Arten angehörten, bewirken könne, die Fähigkeiten dieses Prinzips voneinander verschieden sein müßten, je nachdem es sich auf Kosten der einen oder der anderen Bakterienart entwickelt hätte. Da der Versuch beweist, daß das nicht der Fall ist, daß der Bakteriophage die gleichen Eigenschaften beibehält,

---

1) Um dem Einwand zu entgehen, daß sie mit Mischungen von verschiedenen Bakterienarten hätten gearbeitet haben können (was übrigens wenig ausgemacht hätte, der Wert des Versuchs bliebe derselbe), haben diese beiden Forscher ihre Versuche wieder aufgenommen und gehen von reinen Bakteriophagen aus, die aus Löchern in der Agarkultur isoliert waren.

schloß Maitland daraus, daß dieser Bakteriophage kein Bakterienprodukt ist, daß er dem Bakterium fremd ist.

VI. Asheshov (19) isolierte aus dem Darminhalt eines Schweines 2 verschiedene Bakteriophagenarten, die beide auf den Flexnerschen Ruhrbazillus einwirken, der eine bildet auf dem Agar sehr große Löcher, die einen großen Durchmesser von 12—15 mm haben und von einer angefressen erscheinenden Zone umgeben sind; der andere bildet nur sehr kleine Löcher mit einem Durchmesser von 1—2 mm. Er läßt sie nebeneinander in 2 Passagenreihen auf die gleichen Ruhrstämme einwirken, wobei die beiden Bakterienaufschwemmungen bei jeder Passage aus der gleichen Agarkultur hergestellt werden. Nach einer Reihe von 15 Passagen hat jeder der beiden Bakteriophagen seine Fähigkeit bewahrt, einerseits große, andererseits kleine Löcher zu erzeugen. Wäre der Bakteriophage unmittelbar ein Produkt des Ruhrbazillus, wäre es einleuchtend, daß die beiden Bakteriophagen gleichförmig hätten sein müssen; da dem nicht so ist, kam Asheshov zu dem Schluß, daß der Bakteriophage eine selbständige Einheit darstelle, die vom Bakterium unabhängig ist.

VII. Gratia und de Namur isolieren eine polyvalente Staphylokokkenbakteriophagenart, *h*, die fast gegen die Gesamtheit der Stämme des Staphylococcus aureus, citreus und albus wirksam sind. Andrerseits isolieren sie eine streng monovalente Staphylokokkenbakteriophagenart *V*, die nur einen einzigen Stamm des Staphylococcus albus V angreift.

Sie stellen eine Reihe von Passagen mit dem polyvalenten Bakteriophagen *h* und dem Staphylococcus albus V her und stellen fest, daß die Polyvalenz unbeschädigt bewahrt wird.

Dieser Versuch Gratias (20) erscheint mir besonders eindrucksvoll, und ich wiederholte ihn, wobei ich alle notwendigen Vorsichtsmaßregeln beobachtete, um jeden Einwand zu vermeiden (21).

Um jedem Einwurf zu entgehen, müssen wir darauf achten, daß eine genügende Zahl ununterbrochener Passagen mit dem Staphylococcus V angesetzt wird, damit durch die fortlaufenden Verdünnungen schließlich keine Spur der Ausgangsflüssigkeit vorhanden ist, die der ersten Aufschwemmung des Staphylococcus V zugesetzt wurde, um die Lyse hervorzurufen. Dieser notwendige Verdünnungsgrad läßt sich berechnen: die Physiker haben festgestellt, daß das kleinste mögliche Körperteilchen das Elektron ist, dessen Masse $1 \cdot 10^{-27}$ g beträgt. Wenn wir im Laufe der Verdünnungen in eines der Röhrchen eine Menge der Ausgangsflüssigkeit eingeführt haben, die kleiner ist als $1 \cdot 10^{-27}$, können wir sicher sein, daß in dem Röhrchen keine Spur der Ausgangsflüssigkeit und folglich auch der Bakteriophagenkörperchen *h* vorhanden ist.

Wir legen eine Reihe an, indem wir zu 10 ccm einer Staphylokokkenaufschwemmung V $1 \cdot 10^{-3}$ ccm eines Bakteriophagenfiltrats *h* geben, zu einer 2. Aufschwemmung des Staphylococcus V geben wir $1 \cdot 10^{-3}$ ccm der ersten Aufschwemmung, nachdem sie eine vollständige Lyse durchgemacht hat; in derselben Weise führen wir die Reihen fort, indem wir je $1 \cdot 10^{-3}$ ccm der vorhergehenden Aufschwemmung nach vollkommener Lyse in 10 ccm einer frischen Staphylokokkenaufschwemmung V bringen, man kann dann leicht berechnen, daß in dem 7. Röhrchen der Reihen der Verdünnungsgrad der Ausgangsfähigkeit, die den Bakteriophagen *h* enthält, $1 \cdot 10^{-28}$ ist, d. h., daß 1 ccm $1 \cdot 10^{-28}$ g

enthält. Eine solche Größe ist scheinbar und entspricht keiner wirklichen Vorstellung, da sie kleiner ist als ein Elektron. Man kann also sicher sein, daß das 8. Röhrchen kein bakteriophages Körperchen *h* enthält, das in der Ausgangsflüssigkeit vorhanden war; alle nach beendeter Lyse im 8. Röhrchen nachweisbaren bakteriophagen Körperchen müssen auf Kosten des Staphylococcus V gebildet sein. Der Versuch zeigt nun, daß der im 8. Röhrchen vorhandene Bakteriophage, wie übrigens bei Fortführung der Reihe der auch im 15. Röhrchen enthaltene das Merkmal der Polyvalenz des Bakteriophagen *h* aufweist.

Dieser Versuch, der keinen Raum für Zweideutigkeiten läßt, dessen Ergebnis von absoluter Klarheit ist, da es unmöglich ist, über diese beiden vollkommen verschiedenen Eigenschaften der Mono- und Polyvalenz zu streiten, beweist, daß der Bakteriophage ein selbständiges Wesen ist, das seine eigenen Eigenschaften besitzt und unabhängig von dem Bakterium ist. Der Bakteriophage V, der sich auf Kosten des Staphylococcus albus V vermehrt, ist freilich monovalent, er greift nur den Stamm V an, alle anderen Staphylokokkenstämme entwickeln sich in seiner Gegenwart in normaler Weise: Wenn der Bakteriophage ein Produkt ist, das aus dem Stoffwechsel des Bakteriums stammt, kann dieses Kennzeichen der Monovalenz nur von den Eigenschaften des Staphylococcus V abhängen. Wenn man das aber nicht anerkennt, prüfe man, ob die Fähigkeiten des Bakteriophagen nicht unabhängig von dem Bakterium sein können, das seiner Entwicklung erliegt. Da haben wir den Bakteriophagen *h*, der polyvalent ist, der sich auf Kosten irgend eines Staphylokokkenstammes, sei es aureus, citreus oder albus, entwickeln kann; wir bringen ihn zu seiner Vermehrung mit dem Staphylokokken V zusammen. Wenn die Monovalenz des Bakteriophagen *V* von dem gelösten Bakterium abhinge, müßte auch der Bakteriophage *h* zweifellos monovalent werden, der Versuch zeigt einwandfrei das Gegenteil, er bleibt polyvalent. Es ist also sicher, daß der Bakteriophage Eigenschaften besitzt, die ihm eigentümlich sind, daß er ein autonomes Wesen ist, das unabhängig von dem Bakterium ist, auf das er einwirkt.

Alle diese Versuche, die verschiedene Eigenschaften des Bakteriophagen offenbaren, führen zu derselben Schlußfolgerung: der Bakteriophage ist ein selbständiges Wesen.

5. Assimilationsvermögen des bakteriophagen Körperchens.

Dieser Abschnitt braucht nur kurz zu sein, denn der Beweis der Selbständigkeit schließt schon das Assimilationsvermögen in sich.

Die bakteriophagen Körperchen vermehren sich im Laufe ihrer Tätigkeit und können das nur auf Kosten der „Substanz" des Bakteriums. Da das Bakteriophagenteilchen selbständig, d. h. unabhängig von dem Bakterium ist, wandelt es zwangsmäßig „Bakteriensubstanz" in „Bakteriophagensubstanz" um, dies Körperchen ist also mit dem Assimilationsvermögen im heterogenen Milieu begabt.

6. Das Anpassungsvermögen des bakteriophagen Körperchens.

Das Angriffsvermögen eines bakteriophagen Körperchens gegenüber einem gegebenen Keim ist veränderlich, je nach den gewählten Versuchsbedingungen, es kann sich steigern und vermindern (1, 14).

Es ist unnötig, hierfür Versuche als Stütze anzuführen, denn diese Tatsache wird von niemandem bestritten.

Kann man mit Seiffert (22) sagen, daß es sich nicht um eine wirkliche Verminderung oder Steigerung der „Virulenz" handelt, die das Körperchen gegenüber dem Bakterium aufweist, sondern um eine Veränderung des Bakteriums, das sich daran gewöhnt, das lytische Prinzip zu bilden? Eine solche Erklärung könnte man gelten lassen, wenn wir, nachdem wir eine empfindliche Bakterienkultur mit einem Bakteriophagen von schwacher Wirksamkeit beschickt hätten, ohne weiteres dabei ein Prinzip von gesteigerter Wirksamkeit gewinnen würden. Nun ist dem nicht so: wenn man einen Bakteriophagen von schwacher Wirksamkeit auf eine empfindliche Bakterienkultur einwirken läßt, bildet sich keine Steigerung aus.

Um das lytische Vermögen eines Bakteriophagen von schwacher Wirksamkeit zu steigern, geht man bekanntlich folgendermaßen vor: Man bringt diesen Bakteriophagen in eine Aufschwemmung des ihm gegenüber empfindlichen Bakteriums, nach einem gewissen Zeitraum filtriert man durch eine Kerze, d. h. man erhält ein Filtrat, das wohl bakteriophage Körperchen, aber keinen einzigen Keim enthält; einen Tropfen dieses Filtrats läßt man auf eine neue Aufschwemmung von frischen Bakterien einwirken, in dieser 2. Aufschwemmung sind alle Keime normal, kein einziger ist mit dem Bakteriophagen in Berührung gekommen; man führt die Passagen in gleicher Weise fort, indem man jedesmal einen Tropfen der vorhergehenden filtrierten Aufschwemmung in eine neue Aufschwemmung bringt, die nur normale Bakterien enthält. Man kann feststellen, daß bei jeder neuen Passage das Angriffsvermögen, die „Virulenz", der bakteriophagen Körperchen sich allmählich steigert und schließlich sehr stark wird (1). Wie kann man von Gewöhnung des Bakteriums sprechen, wenn doch bei jeder Passage die Keime der vorhergehenden Verdünnung, die mit dem Bakteriophagen in Berührung gekommen sind, systematisch durch Filtrieren entfernt werden? Nur der Bakteriophage der im Filtrat bleibt, wird durch die Passagen übertragen, er allein hat die Möglichkeit, sich anzupassen, sich zu gewöhnen[1]).

Warum sind wir aber gezwungen, zwischen jeder Passage zu filtrieren (oder zu erhitzen, was weniger empfehlenswert ist)? Weil das Bakterium, wie jedes Lebewesen, gleichfalls die Fähigkeit besitzt, sich anzupassen; aber weit davon entfernt, sich in der Weise anzupassen, daß es ein Ferment erzeugt, das zu seiner eigenen Vernichtung führt, erwirbt es ein Widerstandsvermögen gegenüber der Tätigkeit des Bakteriophagen. Wenn man die Versuchsbedingungen so wählt, daß diese Anpassung sich ausbilden kann, d. h. wenn man zwischen jeder Passage die Filtration unterläßt und man so in die folgende Aufschwemmung Bakterien bringt, die schon mit dem Bakteriophagen in Berührung waren, sind zwei Möglichkeiten

---

1) Die Tatsache des Filtrierens zwischen 2 aufeinander folgenden Passagen oder des Erhitzens auf eine Temperatur, die zur Abtötung der Bakterien führt, genügt schon für sich allein, den Irrtum jener Forscher aufzulockern, die Bordet und Ciuca (23) folgend, die Erscheinung der Bakteriophagie als Folge einer „erblichen Ernährungsstörung" des Bakteriums erklären wollten. Eine solche Erklärung läuft einfach darauf hinaus, daß man zugibt, es könne eine Uebertragung von Eigenschaften stattfinden, ohne daß die Nachkommen überhaupt dabei sind. Es ist ganz unnütz, darauf zu bestehen.

gegeben, je nachdem ob der Bakteriophage mehr oder weniger schwach wirksam ist: entweder gelingt es dem Bakterium, das bakteriophage Körperchen zu zerstören (14, 24), oder dieses Bakterium erlangt die Widerstandskraft (14).

Wie man sieht, paßt sich das Bakterium in der Tat an, aber diese Anpassung führt gerade zum Gegenteil der Bildung eines autolytischen Prinzips, sie führt zu einer Resistenz gegen die Lyse.

Ein anderer Einwand ist von Otto, Winckler und Munter (25) gemacht worden: diese Autoren haben behauptet, daß die Wirksamkeit des Bakteriophagen durch den Vorgang der Filtration und des Erhitzens zustande käme, daß der eine oder andere dieser Eingriffe das lytische Vermögen in der Flüssigkeit bedingt. Nun ist es unnötig, zwischen den Passagen zu filtrieren oder zu erhitzen, wenn man sehr stark wirksame Bakteriophagen hat, die eine vollkommene und fortdauernde Lyse herbeizuführen imstande sind, d. h. daß sich zu keiner Zeit eine „sekundäre Kultur“ bildet. Man kann dann unbegrenzt das bakteriophage Vermögen ohne irgend welche Abschwächung in Reihen fortführen, indem man direkt die normale Bakterienaufschwemmung mit einer Spur der vorhergehenden, durch den bakteriophagen Vorgang gelösten beimpft.

Das zeigt deutlich, daß in den häufigen Fällen von weniger wirksamen Bakteriophagen das Filtrieren oder das Erhitzen einfach die Entfernung der Bakterien bezweckt, die gegenüber dem Angriff der bakteriophagen Körperchen eine genügende Widerstandskraft erworben haben. Weder die Filtration noch die Erhitzung haben irgendwelchen Einfluß auf die Wirksamkeit des Bakteriophagen.

Aber nicht nur die „Virulenz“ des bakteriophagen Körperchens vermag sich auf Grund des Anpassungsvermögens zu steigern, dies Körperchen ist gleichfalls imstande, sich an ungünstige Bedingungen der Umwelt zu gewöhnen.

Ich habe nachgewiesen, daß der Bakteriophage die Fähigkeit besitzt, sich an die schädigende Einwirkung des Glyzerins zu gewöhnen (14).

Prausnitz (6) hat bemerkenswerte Versuche veröffentlicht, die beweisen, daß man den Bakteriophagen daran gewöhnen kann, in Gegenwart von antibakteriophagem Serum Lyse zu bewirken, während vor der Gewöhnung seine Wirkung vollkommen unterdrückt war.

Wolff und Janzen (26) haben gezeigt, daß der Bakteriophage sich an die Einwirkung verschiedener Antiseptika zu gewöhnen vermochte, vor allem an Chinosol.

Asheshov (27) hat dann zeigen können, daß es möglich sei, einen Bakteriophagen daran zu gewöhnen, daß er bei saurer Reaktion Lyse bewirkt, während vor der Gewöhnung dieser Bakteriophage unwirksam war. Ich führe hier seinen Versuch an:

Ein gegen den Flexnerschen Dysenteriebazillus wirksamer Bakteriophage brachte vollkommene Lyse in einer Bouillon von pH = 8,0 zustande, sehr schwache Lyse bei pH = 7,0; bei pH = 6,6 hörte die Wirksamkeit vollkommen auf. Nach einer Reihe von 12 Passagen in Bouillon von pH = 7,0 war die Lyse bei dieser Reaktion vollständig und in Bouillon von pH = 6,6 fast vollständig.

In einem kürzlich erschienenen Aufsatz (28) endlich gaben Prausnitz und Firle, nachdem sie von neuem gezeigt haben, daß der Bak-

teriophage sich an die hemmende Wirkung des antilytischen Serums gewöhnen kann, Versuchsprotokolle an, die die Gewöhnung des Bakteriophagen an die schädigende Wirkung von Phenol, Sublimat und Chloramin dartun.

Ich halte es für unnötig, hier die Versuchsprotokolle der beiden eben angeführten Forscher wiederzugeben, sie zeugen von solchem methodischen Geist, daß ich nicht glaube, daß von nun an irgend jemand die Tatsache der Gewöhnung des Bakteriophagen an schädigende Wirkungen, die ihn zu zerstören trachten, bezweifeln wird; das hieße unnötigerweise diese Ausführungen verlängern, da die Arbeit von Prausnitz und Firle in einer Zeitschrift veröffentlicht ist, die sich auf dem Arbeitstische eines jeden Bakteriologen findet.

7. Das bakteriophage Körperchen: ein lebendes Ultravirus.

Die Erfahrung zeigt uns also, daß das bakteriophage Körperchen ein selbständiges Wesen, die Fähigkeit der Assimilation im heterogenen Milieu und der Anpassung besitzt, sowie die daraus folgenden Eigenschaften der Vermehrung und der Veränderlichkeit. Diese Gemeinschaft von Kennzeichen stellt gerade das „Kriterium" des Lebens dar, das Wesen, das diese Gemeinschaft besitzt, kann nur lebend genannt werden.

Ich möchte sogar etwas aussprechen, was im ersten Augenblick wohl als recht kühn empfunden werden mag: die Lebensnatur des Bakteriophagen ist keine Hypothese, sondern eine Gewißheit.

Die erste aller Einteilungen ist die, welche die dem Menschen bekannten Wesen in 2 große Gruppen trennt: die unbelebten Wesen einerseits, die lebenden Wesen andererseits. Diese Einteilung beruht auf der Tatsache, daß die lebenden Wesen gewisse Fähigkeiten aufweisen, die die anderen nicht besitzen. Von dem Augenblick an, wo man erkennt, daß ein Wesen diese Fähigkeiten besitzt, ist es unwiderruflich in die Gruppe der lebenden Wesen eingereiht.

Erkennt man, daß ein Wesen, das Züge besitzt, die es als lebend kennzeichnen, gewisse Besonderheiten aufweist, die noch bei keinem anderen Wesen dieser Gruppe beobachtet worden sind, so darf doch seine Natur auf keinen Fall in Frage gestellt werden. Von dem Augenblick an, wo es das Kriterium des Lebens besitzt, muß zugegeben werden, daß diese Besonderheit mit dem Leben verträglich ist. Diese Tatsache hat schon in der Geschichte der Wissenschaft eine Rolle gespielt.

Im Falle des Bakteriophagen, der übrigens für alle Ultravirusarten gilt, ist die einzige Besonderheit, die ihn von anderen Lebewesen unterscheidet, seine Kleinheit. Da er Größenverhältnisse aufweist, die denen des Eiweißmoleküls gleichen, scheint es sich nicht um ein Zellwesen zu handeln. Man müßte also zugeben, daß das Leben aus einem physikalisch-chemischen Zustand hervorgeht, der dem Eiweißmolekül eigentümlich ist (33), und da liegt der springende Punkt der Bakteriophagenfrage, denn die Beschäftigung mit diesem Wesen, das wahrscheinlich das einfachste Lebewesen darstellt, das es gibt, kann uns tiefer in die Kenntnis vom Wesen des Lebens eindringen helfen.

Literatur.

1) d'Herelle, Compt. Rend. Acad. des Scienc. T. 165. p. 373. — 2) Ders., Rev. de Pathol. comp. 5. Oct. 1923. — 3) Ders., Tijdschr. v. vergelijk. Geneesk.

10. März 1924. — 4) Ders., Compt. Rend. Soc. Biol. T. 83. p. 247. — 5) Ders., Ibid. T. 81. p. 1160. — 6) Prausnitz, Klin. Wochenschr. Bd. 1. S. 1641. — 7) v. Angerer, Arch. f. Hyg. Bd. 92. S. 312. — 8) Levaditi et Nicolau, Compt. Rend. Soc. Biol. T. 88. p. 66. — 9) d'Herelle, Ibid. T. 82. p. 1237. — 10) Ders., Ibid. T. 83. p. 97. — 11) Eliava et Pozerski, Ibid. T. 84. p. 708. — 12) Bail, Wien. klin. Woch. 1921. S. 555. — 13) Otto u. Munter, Dtsch. med. Woch. 1921. S. 1579. — 14) d'Herelle, Le Bactériophage. T. 1. Paris (Masson édit.) oct. 1921. — 15) Flu, Tijdschr. v. vergelijk. Geneesk. Bd. 10. 1924. — 16) Janzen u. Wolff, Kon. Akad. v. Wetenschappen te Amsterdam. T. 31. Mars 1922. — 17) Dies., Annal. Inst. Pasteur. T. 37. Déc. 1923. — 18) Maitland, Brit. Journ. exp. Path. Vol. 3. p. 173. — 19) Asheshov, Compt. Rend. Soc. Biol. T. 89. p. 120. — 20) Gratia et de Namur, Compt. Rend. Soc. Biol. T. 87. p. 364. — 21) d'Herelle, Ibid. T. 90. p. 25. — 22) Seiffert, Ztschr. f. Hyg. Bd. 98. S. 482. — 23) Bordet et Ciuca, Compt. Rend. Soc. Biol. T. 83. p. 1297. — 24) Flu, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 90. S. 374. — 25) Otto, Munter u. Winckler, Ztschr. f. Hyg. Bd. 96. S. 118. — 26) Wolff et Janzen, Compt. Rend. Soc. Biol. T. 87. p. 1087. — 27) Asheshov, Ibid. T. 87. p. 1342. — 28) Prausnitz u. Firle, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 93. S. 148. — 29) d'Herelle, Compt. Rend. Soc. Biol. T. 87. p. 665. juillet. — 30) Ders., Der Bakteriophage. Uebersetzung von Pfreimbter, Sell und Pistorius. Braunschweig (Vieweg u. Sohn). — 31) Flu, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 90. S. 362. — 32) Ders., Tijdschr. v. vergel. Geneesk. Mars 1924. — 33) d'Herelle, Immunity in natural infectious diseases. 400 pp. Baltimore (Williams a. Wilkins) 1924.

Weitere Untersuchungen über das übertragbare, alkalibildende Agens in der Coli-Gruppe.

[Aus dem Institut für allgemeine und experimentelle Pathologie der Universität Wien.]

Von Dr. **E. Löffler.**

In einer vorhergehenden Arbeit gingen wir in Gemeinschaft mit Chiari[1]) von der Tatsache aus, daß sich auf manchen Stuhlplatten, je nach Verwendung von Endo- oder Drigalski-Agar farblose, bzw. blaue Anteile finden. Als Ursache hierfür konnten wir die Alkaliproduktion gewisser Colistämme aufzeigen. Diese Stämme bilden nicht nur selbst Alkali, sondern regen auch andere zur Alkalibildung an. Nach der verwendeten Versuchsanordnung konnten wir es wahrscheinlich machen, daß es sich hierbei um ein Agens handle, welches aus dem jeweils neu hinzugefügten Stamm regeneriert wird, so lange dieser unter dem Einfluß des Bacterium coli alcaligenes steht.

Im folgenden wird über Untersuchungen berichtet, die dahingingen festzustellen, ob gemeine Colistämme auch durch andere Einflüsse als die der Coli alcaligenes-Stämme zur Alkaliproduktion angeregt werden könnten.

Versuch 1. Endo-Platte mit einer Reinkultur von Bacterium coli commune dicht bewachsen und zur Gänze gerötet. Der Rand

1) Dieses Centralblatt. Bd. 96. H. 2.

der Platte wird mit einem alkalibildenden Schimmelpilz beimpft und bei Zimmertemperatur belassen. Nach einiger Zeit findet sich um den gewachsenen Pilz ein breiter, in konzentrischen Schichten immer weiter fortschreitender farbloser Hof, der sich auch dann noch vergrößert, wenn der Pilz ganz mit dem unter ihm liegenden Nährsubstrat entfernt worden ist. Auch die von dem Pilz weiter gelegenen Teile des Nährbodens mit seinen Kolonien können entfernt werden, ohne daß das Wachstum innehält, falls nur ein schmaler aufgehellter Rand geschont ist. Mit den aufgehellten Anteilen können auf neuen Platten sekundäre Aufhellungszonen und weitere Passagen erzielt werden. Im gleichen Sinne verläuft der Versuch, wenn man eine Endoplatte frisch streicht und gleichzeitig am Rande mit Schimmelpilz beimpft. Es läßt sich noch auf andere Weise zeigen, daß das Fortschreiten des weißen Hofes weitgehend vom Wachstum des Pilzes unabhängig ist. Hat sich einmal der farblose Anteil um den Pilz gebildet, so kann man das weitere Wachstum des Pilzes durch Herausnahme des Nährbodens in seiner Umgebung unterbrechen, ohne daß dadurch das weitere Fortschreiten der weißen Zone jenseits der Agarlücke gehemmt wird.

Durch das vom Pilz produzierte Alkali werden gewöhnliche Stämme so beeinflußt, daß sie typische sekundäre weiße Flecke erzeugen.

Versuch 2. Beeinflussung der Bakterien der Typhus-Coligruppe untereinander.

Der Vorversuch für diese Art der Untersuchung wurde derart angestellt, daß auf eine Endo-Agarplatte eine Reinkultur von B. typhi sehr dicht ausgestrichen und darüber an angezeichneten Stellen B. coli com. geimpft wurde. Nach 24std. Bebrütung ist auch der sonst rot wachsende Colistamm in farblosen Kolonien gewachsen, die sich jedoch von den zarten Kolonien des B. typhi durch ihre opake Beschaffenheit gut abheben. Mit Hilfe dieser, mit dem Nährboden exzidierten, farblos gewachsenen Colikolonien konnten sekundäre Aufhellungszonen und Passagen erzielt werden. Zu demselben Ergebnis gelangt man, wenn man die Versuchsanordnung folgendermaßen modifiziert: Dem verflüssigten und abgekühlten Endonährboden werden 1—3 ccm einer sehr dichten Typhusbazillenaufschwemmung zugefügt, hierauf die Platte gegossen und mit B. coli com. beimpft. Nach Bebrütung ist das B. coli in farblosen Kolonien gewachsen, während Kontrollplatten mit durch Hitze abgetöteten Typhusbazillen denselben Stamm in roten Kolonien wachsen ließen.

Weitere Versuche wurden dann derart angestellt: Es wurden Endoplatten mit Reinkulturen von Bacterium coli beimpft, ein Stückchen frisch gestrichenen Typhus-Endo-Agars auf frisch gestrichene Coli-Endoplatten gelegt. Nach Bebrütung zeigte es sich, daß im ersten Falle die Coli-Kolonien in farblosen Kolonien wuchsen, während sich bei der zweiten Versuchsanordnung um die aufgelegten Typhusstückchen auf der Coliplatte farblose Höfe zeigten, welche dann weiter wuchsen und mit deren Hilfe Passagen angelegt werden konnten. Dasselbe Ergebnis erzielt man bei Verwendung von 24—48 Std. alten Kulturen, die dann in der Regel bei Zimmertemperatur belassen wurden. Hier werden die auf Typhusplatten übertragenen roten Colistüchchen aufgehellt, ebenso wie die Kolonien auf der sonst roten Coliplatte um das aufgelegte Typhusstückchen. Auch die Kombinationen Typhusplatte, frisch gestrichen — 24 Std. alte Coliplatten und umgekehrt zeigten dasselbe Ergebnis. Dabei konnte die Beobachtung gemacht werden, daß

sehr dünne mit Colikolonien bewachsene rote Endostückchen auf eine 24std. Typhus-Endoplatte übertragen in kurzer Zeit ($^1/_2$ bis 2 Std.) beinahe vollkommen aufgehellt wurden. Im allgemeinen muß überhaupt bemerkt werden, daß bei der angegebenen Versuchsanordnung quantitative Verhältnisse eine gewisse Rolle spielen: Die aufgelegten Colistückchen dürfen nicht zu dick sein, die Coliplatte wiederum, auf die die Typhusstückchen gebracht werden, nicht zu dick gegossen und zu dicht bewachsen sein, da sonst die übermäßige Säureproduktion nicht überwunden werden kann. Ist jedoch einmal die Aufhellung eingetreten, so schreitet sie unaufhaltsam vor und macht auch bei ungleichmäßig gegossenen Platten vor den dicken Partien nicht Halt.

Bedient man sich der angegebenen Versuchsanordnung unter anaëroben Verhältnissen, so bleibt die Aufhellung aus, was mit den Erfahrungen von Chiari und Verfasser an den weißen Flecken übereinstimmt.

Außer dem B. typhi wurden zu derartigen Versuchen herangezogen: B. paratyphi A und B, B. enteritidis Gärtner, B. dysenteriae Flexner, Y, Strong, Shiga-Kruse und B. faecalis alcaligenes, im allgemeinen immer mit demselben Ergebnis.

Viel ungleichmäßigere Resultate erhält man, wenn man sich bei dieser Art von Versuchen des üblichen festen Mannitnährbodens bedient. Wohl konnte manchmal Bläuung des Colistammes und auch des Typhusstammes in Form eines wachsenden Hofes erzielt werden, häufiger noch bei Verwendung von alten Platten, meist blieb sie jedoch aus. Dies ist wohl auf einen Ueberschuß von Säure, die ja hier von beiden Komponenten gebildet wird, zurückzuführen. Bei der Kombination von Coli mit B. faecalis alcaligenes trat die Bläuung der Colistämme regelmäßiger ein. Konstant war die Bläuung, wie bereits in der früheren Arbeit festgestellt, bei Verwendung von B. coli alcaligenes.

Fassen wir das Ergebnis der 2. hier beschriebenen Art der Erzeugung von farblosen, bzw. blau wachsenden Stämmen zusammen, so müssen wir sagen, daß der hervorstechenste Umstand das Wachstum der Kolonien übereinander ist. Da ein ähnliches Verhalten bei nebeneinander verstrichenen Kolonien, auch wenn sie sehr dicht stehen, nicht zu beobachten ist, kommen als Ursache hierfür lediglich 2 Momente in Betracht: eine innigere Beeinflussung der Bakterien untereinander durch ihre Stoffwechselprodukte und einen gewissen Grad von Anaërobiose. Das ein leichter Grad von Luftabschluß eine gewisse Rolle bei der Aktivierung von fermentativen Prozessen spielen kann, geht z. B. aus der Arbeit von R. Maresch[1]) „Ueber das Verhalten von Bakterien und Geweben auf Blutagar bei Luftabschluß" hervor, aus der zu ersehen ist, daß aërobe Bakterien, mit sterilen Deckgläschen bedeckt, gewisse Verfärbungen auf Schottmüller-Platten erzeugen, trotzdem diese Art des Luftabschlusses obligat anaëroben Bakterien kein Wachstum ermöglicht. Das Ausbleiben der weißen Flecke unter vollkommenen anaëroben Verhältnissen würde also nicht gegen eine unterstützende Wirkung des partiellen Luftabschlusses sprechen. Andererseits ist den hier neben den Colistämmen verwendeten Bakterienarten gemeinsam, daß sie Milchzucker nicht angreifen und daher die Alkalität des Nährbodens erhöhen. Durch das Zusammenwirken dieser Umstände könnte es zum Freimachen des alkalibildenden Endofermentes

1) Verhandlungen der Deutschen Pathol. Gesellsch., 15. Tagung, 1912.

aus gemeinen Colistämmen kommen. Dieses greift, wie bereits mehrfach erwähnt, wenn es einmal frei gemacht ist, weiter auf benachbarte Kolonien über und regeneriert sich dabei fortdauernd. Vergleichen wir die oben geschilderte Art der weißen Flecke mit der unter Influenz des B. coli alcaligenes gebildeten, so sehen wir eine Differenz lediglich bei der Entstehung derselben. Coli alcaligenes läßt weiße Flecke von einem gemeinen Coli auch dann erzeugen, wenn die Kolonien der beiden Colirassen auf einer Platte in nicht zu großer Entfernung nebeneinander stehen. Es gelingt nämlich die Uebertragung der weißen Flecke auf einen gemeinen Coli auch dann, wenn man eine Platte teilt, die eine Hälfte mit dem Coli alcaligenes-Stamm, die andere mit einem gemeinen Coli beimpft. Der weiße Fleck des Coli alcaligenes greift alsdann in kontinuierlichem Wachstum auch auf den gemeinen Coli über. Typhus-, Paratyphus-, Dysenteriestämme rufen dagegen nur dann weiße Coliflecke hervor, wenn die jeweils gewählte Bakterienart direkt über oder direkt unter dem Colistamm wachsen. Im Gegensatz zu dieser Differenz bei der Entstehung ist das Verhalten der einmal vorhandenen weißen Flecke. Sind sie nämlich einmal gebildet, so vergrößern sie sich in typischer Weise und lassen sich mit der üblichen Technik weiter übertragen.

Kontrollversuche vorgenommen durch Uebereinanderschichten von Colistämmen verschiedener Provenienz, Ueberschichten von Kolonien mit unbewachsenem Agar hatten ein negatives Ergebnis.

Versuch 3. Hier bedienten wir uns der direkten Einwirkung von Alkali auf das Bacterium coli. Durch einige Tropfen Kalilauge wurde auf einer mit Bacterium coli com. bewachsenen roten Endoplatte ein farbloser Fleck erzeugt, dieser dann exzidiert und auf eine frisch gestrichene und 24 Std. alte Coliplatte gebracht. Am nächsten Tag war ein farbloser Hof zu sehen, der sich wieder so verhielt wie die beschriebenen. Weiter stellten wir uns durch Zusatz von Kalilauge einen Endonährboden her, auf dem Bacterium coli nicht mehr wuchs. Stückchen von mit Bacterium coli com. bewachsenen roten Endo, auf solchen alkalischen Endo gelegt, wurden entfärbt, frisch beimpfte wuchsen in farblosen Kolonien. Diese aufgelegten Endostückchen konnten, auf neue Coli-Endoplatten gebracht, wachsende weiße Flecke erzeugen. — Ein Stückchen des alkalischen Endonährbodens, auf eine 24 Std. alte rote Coliplatte gebracht, erzeugte einen wachsenden farblosen Hof. Wurde jedoch ein Stückchen desselben alkalischen Endonährbodens auf eine frisch beimpfte Coli-Endoplatte gebracht, so blieb die Hofbildung nach der Bebrütung aus. Endoplatten so hoher Alkalinität, daß das Bacterium coli auf ihm in farblosen Kolonien wuchs, konnten bei Uebertragung nach der üblichen Methode ebenfalls rote Coli-Endostückchen entfärben; um bewachsene Stückchen dieser Platten war Hofbildung zu beobachten; immer gelangen dann weitere Passagen.

Hier wäre noch eine Beobachtung anzuführen: auf durch N/10-Sodalösung etwas stärker als üblich alkalisierten Endoplatten wuchsen manche gemeine Colistämme mit einem weißen Fleck, der sich ausbreitete und sich ebenso übertragen ließ wie jeder sekundäre Fleck. Auch um abnorm dünne Stellen ungleichmäßig gegossener Platten trat manchmal bei einzelnen Stämmen ein weißer Fleck auf, der dann wachsend auch auf die dicken Stellen der Platte übergriff und ebenfalls in Passagen übertragen werden konnte. Da unter diesen Bedingungen

lediglich ein größerer oder geringerer Teil der untersuchten Colistämme in der geschilderten Weise reagierte, muß man wohl annehmen, daß es sich hier um Verschiedenheiten der einzelnen Colistämme handelt, die auf ein verschiedenes Säurebildungsvermögen zurückzuführen sind.

Die durch die mitgeteilten Methoden weiß gewordenen Colistämme verhalten sich so wie die durch die Coli alcaligenes-Stämme sekundär entfärbten gemeinen Colistämme: Isoliert abgeimpfte farblose Kolonien wachsen auf frischen Endo verstrichen in roten Kolonien.

Ueberträgt man jedoch von derartigen weißen Kolonien sehr reichlich auf neue Platten, dann treten wieder weiße Flecke auf. Bezüglich der Passagen läßt sich sagen, daß einmal in farblosen Kolonien gewachsener Coli immer wieder andere Stämme zur Alkaliproduktion anregen kann. Aus den mit dem B. coli alcaligenes gesammelten Erfahrungen und aus den eben mitgeteilten Versuchen schließen wir, daß die geschilderten Beobachtungen durch ein übertragbares alkalibildendes aërophiles Endoferment bedingt sind, welches den Bakterienleibern latent innewohnt und durch Alkali in Wirksamkeit gesetzt werden kann. Durch das durch dieses Ferment gebildete Alkali wird wieder Ferment in den benachbarten Kolonien frei gemacht; dadurch erklärt sich das kontinuierliche Wachstum der weißen Flecke.

Schließlich wollen wir bemerken, daß sich unter den verwendeten Laboratoriumsstämmen der Typhus-Coligruppe ein Flexner-Stamm fand, der sich kulturell und agglutinatorisch wie ein gewöhnlicher Flexner-Stamm verhielt, auf festen Mannit-Nährboden gebracht, jedoch mit einem blauen Fleck wuchs, der sich ausbreitete und in Passagen auch auf andere Stämme übertragen werden konnte. Mutatis mutandis kann man sagen, daß dieser Dysenteriestamm in dieser Hinsicht weitgehende Aehnlichkeit mit dem Bacterium alcaligenes zeigt; bezeichnenderweise wuchs auch er in Bouillon unter Bildung eines Oberflächenhäutchens.

Zusammenfassung.

Durch verschiedene Eingriffe kann aus gemeinen Colistämmen ein Endoferment frei gemacht werden, das in jeder Beziehung dem von Verfasser in Gemeinschaft mit Chiari beschriebenen übertragbaren aërophilen Ferment des Bacterium coli alcaligenes entspricht.

Ueber Scharlachvakzine, ihre Zubereitung und Kontrolle.

[Aus dem Bakteriologischen Institut zu Charkow (Ukraine).]

Von Prof. **S. J. Zlatogoroff.**

Die Frage der Anwendung der aktiven Scharlachimmunisation interessiert zurzeit ganz besonders. Die rein hygienischen Maßnahmen im Kampfe gegen den Scharlach haben sich als wenig wirksam erwiesen, so daß es naheliegt, nach einer wirksamen Schutzimpfung

gegen Scharlach zu suchen. Sodann haben die neuesten Arbeiten amerikanischer, italienischer und deutscher Autoren über die Aetiologie des Scharlachs wieder die Frage der Scharlachpathogenese sehr in den Vordergrund des Interesses gerückt. Die hierbei unvermeidlichen Differenzen zwischen den einzelnen Autoren erinnern daran, daß der Streit über den Scharlacherreger ein alter ist, und daß er schon zu wiederholten Malen den aktiven und passiven Kampf gegen Scharlach nicht wenig gehemmt hat.

Als Erreger des Scharlachs sind angesprochen worden: ein filtrierbares Virus (Bernhardt, Cantacuzène, Levaditi, d'Hektoen), Streptokokken (Escherich, Baginsky, Gabritschevsky, Dick, Zingher, Kuczinsky), durch Streptokokkeninfektion bedingte Anaphylaxie (Schiff, Meyer, Bürgers) und die Scharlach-Mikroben italienischer Autoren (Di Cristina, Caronia, Sindoni); schließlich sei Szontaghs Theorie über die nichtspezifische Körpersensibilisation durch verschiedene äußere und innere scharlacherregende Momente erwähnt. Keine von diesen angeführten Theorien hat allgemeine Anerkennung finden können, keine besitzt eine ausreichende experimentelle Begründung. Nur eins muß als unbestritten anerkannt werden, das ist die bedeutsame Rolle, die die Streptokokken bei Scharlachkomplikationen spielen, und die Tatsache, daß sie in den inneren und äußeren Absonderungen des Scharlachkranken oft mit dem spezifischen Scharlachvirus zusammen angetroffen werden.

Die Versuche mit filtrierbarem Virus, Gabritschevskys Versuche mit Streptokokkenvakzine, sowie die Streptokokkenversuche amerikanischer Autoren lassen keinen Zweifel darüber, daß Scharlachvirus und Streptokokken im Blute, Rachenschleim und Zungenbelag häufig gleichzeitig anzutreffen sind. In welcher Beziehung das Virus zu den Streptokokken steht, ob es mit ihnen eine Einheit bildet, oder ob es selbständig existiert, muß noch experimentell geprüft werden. Selbst ein so überzeugter Anhänger der Scharlach-Streptokokkenätiologie, wie Dick, sagt in seiner letzten Arbeit, daß nicht jeder aus dem Scharlachkranken isolierte Streptokokkus der eigentliche Scharlacherreger sei, und daß nur die beim Menschen experimentell Scharlach hervorrufenden Streptokokken zur Herstellung von Vakzinen und Toxinen Verwendung finden dürfen, sowie daß solche Streptokokken immer hämolytisch sind.

Es gibt noch manchen ungeklärten und unbewiesenen Punkt in der amerikanischen Lehre von dem Streptokokkus als Scharlacherreger, aber diese Lehre hat uns Kenntnis gegeben von der Existenz eines Scharlach-Toxins, oder vielleicht eines für die Neutralisation des Scharlach-Antitoxins notwendigen Endotoxins.

Wir möchten hier aber eine weitere Erörterung der Frage nach der eigentlichen Natur des Scharlachvirus zurückstellen und uns zunächst nur darauf beschränken, unter Benutzung des ganzen auf diesem Gebiete inzwischen angewachsenen Materials das Problem der Zubereitung einer Scharlachvakzine in Verbindung mit den von mir erwähnten Tatsachen über den Zusammenhang zwischen Streptokokken und Virus einerseits und dem von den amerikanischen Autoren gefundenen spezifischen „Scharlach-Toxin“ andererseits zu besprechen.

Wie ich in meiner Arbeit „Biologische Kontrolle des Moserschen Serums“ (Prophylakt. Med. 1924. S. 168) erwähnt habe, zeigt das Schultz-Charltonsche Auslöschphänomen die Anwesenheit von spezifischen Antikörpern im Serum an, die imstande sind, eine spezifische Wirkung auszuüben und das Scharlachgift in allen seinen Erscheinungen zu neutralisieren.

Wenn das Scharlach-Exanthem oder irgendeine andere durch das Scharlachtoxin hervorgerufene Hautveränderung, z. B. ein Infiltrat, durch ein im aktiven Serum befindliches Antitoxin neutralisiert wird, dann müssen wir die Ursache dieser Veränderungen als ein spezifisches Agens für Scharlach anerkennen.

Unsere Aufgabe besteht somit darin, die Anwesenheit eines spezifischen Scharlach-Agens in dem zur aktiven Immunisation zur Verwendung kommenden Stoffe nachzuweisen.

Was für eine Vakzine müssen wir gebrauchen, um überzeugt zu sein, daß sie das spezifische Scharlach-Agens enthält?

Wie bekannt, wurde die erste Scharlach-Vakzine 1905 von Gabritschevsky angegeben. Diese wurde aus Streptokokken hergestellt, die aus dem Herzblut von Scharlach-Leichen kurz nach dem Tode entnommen waren. Dieser Autor unter-

strich die Notwendigkeit, die Vakzine mit der ersten Generation herzustellen, und zwar der 2tägigen Bouillonkultur solcher Streptokokken nach vorheriger Abtötung durch Erhitzen.

In der Praxis hat sich gezeigt, daß Gabritschevskys Vakzine in einer Anzahl von Fällen tatsächlich wirksam war und nach dreimaligem Gebrauch Immunität ergab, indem sie die Epidemie unterbrach und in die Epidemiekurve eine Reihe von Veränderungen brachte (nach Beobachtungen in Schulen, Internaten, Dörfern, Städten: Petrograd, im Ekaterinoslawer, Moskauer und Saratower Gouvernement), während sie in anderen Fällen ganz unwirksam blieb.

Erst heute, nach vielen Jahren, können wir verstehen, warum es so war. Ohne allen Zweifel hatten die verschiedenen Serien der Vakzine verschiedene Wirksamkeit, da nicht bei jeder Blutsaat mit dem Streptokokkus auch das Scharlachvirus in die Nährböden geimpft wurde, da dieses im Blute unregelmäßig verteilt ist (Versuche mit filtrierbarem Virus). Außerdem verstehen wir jetzt die Forderungen von Gabritschevsky und Moser, nur die 1. Generation zu benutzen und die Kultur nicht durch Tiere zu schicken, weil wir alsdann mehr Chancen haben, das Virus mitzuerhalten.

Die Aktivität, welche einige Serien epidemiologisch dokumentiert haben, hat sich auch durch klinische Erscheinungen, wie Angina, Exanthem und Desquamation bei den Geimpften bestätigt, ohne daß diese Erscheinungen eine Ansteckungskraft besäßen, d. h., die Vakzinen enthielten Substanzen, die nur einen Teil der Scharlacherscheinungen hervorrufen.

Außer den letztgenannten klinischen Erscheinungen, die von vielen als ein Resultat der Vakzination bestritten werden, und außer sehr widersprechenden epidemiologischen Tatsachen besaß Gabritschevsky kein Kriterium, um die Aktivität seiner Vakzine zu beweisen. Jetzt, nach dem Erscheinen der Arbeiten der amerikanischen Autoren, die die Bedeutung der hämolytischen Streptokokken, an die offenbar das Scharlachvirus häufiger gebunden ist als an die nichthämolytischen, betonen, können wir sagen, daß die Scharlachkranken nicht immer unbedingt hämolytische Streptokokken ausscheiden, was bei dem Untersuchungsmaterial von Gabritschevsky offenbar auch der Fall gewesen ist.

Da wir nun nach diesen Arbeiten und dank der Entdeckung des Auslöschphänomens wissen, auf welche Weise wir ein aktiveres Scharlachtoxin gewinnen und dessen Spezifizität nachweisen können, sind wir in der Lage, Methoden zu finden, die uns die Herstellung einer Vakzine ermöglichen würden, welche von den Nachteilen der Gabritschevskyschen Vakzine frei wäre.

Da wir uns vorstellen, daß die Gabritschevskysche Vakzine eine prophylaktische Wirkung sowohl gegen die komplizierende Wirkung der Streptokokken (durch ihre eigenen Streptokokken) als auch gegen das Scharlachvirus (falls letzteres in der Vakzine in genügender Menge enthalten ist) haben muß, so machten wir es uns zur Aufgabe, eine Anti-Scharlachvakzine herzustellen, indem wir vom hämolytischen Streptokokkus ausgingen.

Die amerikanischen Autoren bereiten die Vakzine nur aus Kulturfiltraten des hämolytischen Streptokokkus. Wir konnten uns von den Vorzügen dieser Methode vor derjenigen von Gabritschevsky, welcher Reinkulturen verwandte, nicht überzeugen. Dick ist der Ansicht, daß der hämolytische Streptokokkus ein spezifisches Ektotoxin ausscheidet, weshalb er filtriert und das Filtrat benutzt. Wenn wir mehrere Tage alte Kulturen verwenden, so haben wir dasselbe Toxin + Bakterienkörper. Um ferner eine solche Kultur des hämolytischen Streptokokkus zu gewinnen, welche eine größere Menge der die spezifischen Scharlacherscheinungen hervorrufenden Substanzen enthielte, wählten wir nach dem Beispiel der amerikanischen Autoren mehrere Tage alte Kulturen (4 Tage).

Damit wir aber die Ueberzeugung hätten, daß die Vakzine das spezifische Scharlachvirus und dessen Gift enthält, unterzogen wir jede Serie einer biologischen Kontrolle.

Wie kann man sich nun diese Kontrolle der Scharlachvakzine vorstellen? Das Sicherste wäre, wenn wir ein Virus hätten, das beim Menschen Scharlach hervorruft, wie dies die amerikanischen Autoren tun, wenn sie von Streptokokken sprechen, die beim Menschen einen experimentellen Scharlach erzeugen. Eine solche Kontrollmethode kommt bei uns nicht in Betracht. Es bleibt also nur der Versuch übrig, bei Tieren einen experimentellen Scharlach mit unserem Stamm hervorzurufen. Nur beim Experimentieren mit Affen und Kaninchen dürfen wir auf einen Erfolg hoffen, letzterer ist jedoch unbeständig und erfordert recht viel Zeit.

Mithin fällt die Möglichkeit, sich der erwähnten Methoden für praktische Zwecke zu bedienen, weg.

Wir müssen uns also an andere Methoden halten, die man in zwei Gruppen einteilen kann: die Methoden der ersten Gruppe basieren auf der spezifischen Reaktion des menschlichen oder tierischen Organismus, dem ein Scharlachvirus einverleibt wird; die der zweiten Gruppe beruhen auf der Neutralisierung des Scharlachvirus durch Scharlachantitoxin.

Zur ersten Gruppe gehört die Ausarbeitung von spezifischen Antikörpern durch Tiere bei der Immunisierung mit Scharlachmaterial, die das Toxin neutralisieren. Dieses Verfahren kann nur ein akademisches Interesse haben, da solche Antikörper erst nach langdauernder Immunisation (nach 2—3 Mon.) ausgearbeitet werden. Zu dieser Gruppe kann man noch die spezifische Reaktion hinzurechnen, welche durch die intrakutane Einverleibung von aus Scharlachstreptokokken hergestelltem Scharlachtoxin hervorgerufen wird, wie dies Dick und Zingher empfehlen: bei wissentlich Scharlachkranken erhält man nach den amerikanischen Angaben bis zum 4. Krankheitstag in 100 Proz. eine positive Reaktion, während bei Genesenden in der 3.—4. Woche die Reaktion meistens negativ ausfällt.

Das in unserem Institute (Dr. Kandyba) nach dem amerikanischen Verfahren aus unseren aktiven Strepto-Kulturen hergestellte Toxin hat vorläufig die Angaben der amerikanischen Autoren über die spezifische Reaktion des Toxins nicht in vollem Maße bestätigt, weshalb wir zurzeit von der Anwendung dieser Methode absehen.

Bedeutend wirksamer erwies sich für diese Zwecke der Organismus junger Kaninchen. Ein junges Kaninchen von 600—800 g Gewicht ist außerordentlich empfindlich gegen die intrakutane Einverleibung (0,2) von Scharlachvakzine sowohl als auch von aus Streptokokkenkulturen gewonnenen Filtraten: die Vakzine ruft ein Infiltrat hervor, das 12 bis 36 Stunden anhält, das Filtrat eine Hyperämie und ein leichtes Infiltrat, das nach 8—12 Std. auftritt und nach 24—36 Std. verschwindet.

Ein weiterer Beweis für die Aktivität der Vakzine ist die Wirkung derselben auf den menschlichen Organismus bei der Immunisierung: Angina, Scharlachexanthem und Hautabschuppung, wenn die Angina und Hautabschuppung 48—72 Std. nach der Vakzineeinverleibung auftreten. Nicht immer lassen sich alle drei Symptome hervorrufen; häufig sehen wir nur eine Angina oder ein Exanthem allein.

Praktisch sind von sämtlichen Methoden der ersten Gruppe nur diejenigen anwendbar, welche auf der Prüfung des Materials an Kaninchen und auf dem Hervorrufen von reaktiven Erscheinungen bei den Geimpften beruhen. Letztere Methode hat jedoch nur eine geringe Beweiskraft, da die erwähnten Reaktionen beim Menschen nur in 1—5 Proz. (je nach der Vakzine und dem Alter der Geimpften — Individuen im Alter von 3—7 Jahren liefern den größten Prozentsatz der Reaktion —) auftreten.

Zu den Methoden der zweiten Gruppe gehört: die Neutralisation des im aktiven Serum befindlichen Scharlachantitoxins durch Vakzine, welch' ersteres das Auslöschphänomen gibt. Der Versuch wird am Menschen zur Zeit, wo das Exanthemen auf dem Höhepunkt ist, angestellt.

Eine ebensolche Vakzineneutralisation kann man beim auf subkutane oder intrakutane Vakzineeinverleibung reagierenden Menschen erzielen, wenn man das aktive Serum mit Vakzine mischt.

Junge Kaninchen, bei denen Toxin oder Vakzine eine Reaktion hervorruft, können gleichfalls auf die Neutralisation des Virus geprüft werden: ein Gemisch von Vakzine oder Toxin mit aktivem Serum ruft beim Kaninchen keine Reaktion hervor (unsere gemeinsam mit Dr. Derkatsch angestellten Versuche).

Aus dieser Gruppe ist die Methode der Einwirkung auf das aktive Serum durch das zu prüfende Virus mittels Beseitigung des Auslöschphänomens beim Menschen als die beste zu bezeichnen.

In denjenigen Fällen, wo keine passenden Kranken zur Verfügung stehen, kann man sich entweder auf die Intrakutanreaktion bei gesunden reagierenden Menschen oder, besser, auf die Reaktion bei Kaninchen beschränken.

Zur Ausführung all dieser Proben ist ein Material nötig, das seiner Zusammensetzung nach dem Auftreten der Reaktion und der physikalisch-chemischen Wechselwirkung zwischen Antikörper und Antigen nicht hinderlich wäre. Das beste Objekt hierfür ist nicht die Vakzine als solche, da sie antiseptische Substanzen enthält und gewöhnlich durch das Erhitzen oder durch chemische Stoffe erheblich deformiert ist, sondern das Filtrat (Berkefeldsches Filter) einer 4 Tage alten Streptokokken-Bouillonkultur, die bei 37° aus demselben Stamme gezüchtet wurde, aus welchem die Vakzine hergestellt war, ohne Zusatz von antiseptischen Substanzen und ohne Erhitzen. Mit unverdünnter Vakzine kann man gleichfalls alle Proben anstellen, nur müssen unbedingt parallel Proben mit den Filtraten aus denselben Kulturen ausgeführt werden.

Unwillkürlich drängt sich die Frage auf, wie oft wir auf Grund der biologischen Prüfung der Vakzinen letztere als den Kontrollforderungen nicht genügende verwerfen müssen?

Wir halten es für notwendig, wenigstens mit einer Prüfungsmethode ein positives Resultat zu erhalten, natürlich ist aber die Vakzine um so aktiver, je mehr Methoden ein positives Resultat ergeben.

Von jeder Serie, die wir herauslassen, wird, bevor sie in Ampullen verteilt wird, eine Prüfung mit dem Filtrat wenigstens nach drei Methoden vorgenommen:

a) Neutralisation des aktiven Serums am Auslöschphänomen beim Menschen,

b) Reaktion bei jungen Kaninchen (intrakutan),

c) Neutralisation der Hautreaktion bei Kaninchen mittels aktiven Serums.

Wenn wenigstens mit einem der erwähnten Verfahren ein positives Resultat erzielt wird, wird die Vakzine verteilt, und es werden nunmehr mit ihr nochmals dieselben Reaktionen angestellt, um von der Vakzine selbst nach dem Zusatz von antiseptischen Substanzen eine genaue Vorstellung zu erhalten. Jedoch halten wir diese zweite Prüfung nicht für obligatorisch. Viel wichtiger ist es, Angaben über die klinische Aktivität der Vakzine nach den Impfungen zu haben, und falls die Resultate positiv ausgefallen sind, ist eine solche Vakzine für die Freigabe allen anderen vorzuziehen.

In unserem Institute wurde eine Reihe von Vakzinen nach der Prüfung als untauglich zurückgewiesen, und von den verschiedenen Vakzinen, welche das Institut in der letzten Zeit freigab, erwiesen sich diediejenigen als die aktivsten, welche aus Hämokulturen angefertigt waren und der 1. Generation näher standen. Somit findet der Satz von Gabritschevsky über die ersten Generationen seine Bestätigung. Was nun die Qualität der von unserem Institute von Scharlachkranken abgesonderten Kulturen anlangt, so haben von den bis jetzt studierten 22 Hämokulturen 2 kaum hämolysiert, 20 stark hämolysiert; von 156 Streptokokkenkulturen, die vom Rachen gewonnen waren, haben 4 schwach, 5 nicht und 147 stark hämolysiert.

Methodik der Vakzinezubereitung, wie sie gegenwärtig im Charkower Bakteriologischen Institut geübt wird:

Aussaat aus dem Herzblute einer Leiche oder aus dem Blute eines Kranken auf Bouillon mit Traubenzucker (1 Proz.) und Pepton (1 Proz.). Gleichzeitig Aussaat auf Blutagar (mit Hammelerythrozyten), um das Hämolysierungsvermögen zu bestimmen. Wenn der Streptokokkus als hämolytisch sich erwies, wird die Bouillonkultur nach zweitägigem Wachstum gut durchgeschüttelt, mit einer Aussaat in Kolben mit Bouillon von derselben Zusammensetzung vermischt und das Ganze 96 Std. bei 37° aufbewahrt. Aus der Gesamtkultur wird ein Filtrat zubereitet, welches zum Versuche dient. Der Kultur werden 0,5 Proz. Phenol hinzugesetzt, worauf sie mit physiol. Kochsalzlösung bis zum Standard von 1000 Millionen Bakterienkörper in 1 ccm verdünnt wird. Die Anwesenheit von Kohlehydraten im Nährboden begünstigt in hohem Maße das Wachstum der Streptokokken, hat aber ihre Nachteile: bei der Spaltung der Kohlehydrate findet eine Säurebildung statt; so erreicht Ph, welches vor der Aussaat = 7,4 war, nach 4 Tagen den Wert von 4,8. Und die Toxizität einer solchen Kultur ist (vom Standpunkt der amerikanischen Autoren aus) eine bedeutend geringere als die Toxizität derjenigen Kulturen, bei welchen Ph = 7,4 unverändert geblieben ist.

Wir halten es für besonders wünschenswert, in der Vakzine die 1. Generation zu haben, dies ist jedoch aus technischen Gründen nicht immer möglich, weshalb wir uns mit der 2. Generation zufrieden geben, unter der Bedingung, daß dem Nährboden eine große Menge von der Kultur der 1., mit Blut vermischten Generation zugesetzt wird.

In jeden Bouillonkolben bringen wir nicht weniger als 10 ccm von der Kultur der 1. Generation.

Zur biologischen Kontrolle ist das Serum von Scharlachgenesenden in der 4.—5. Krankheitswoche erforderlich, und wenn dieses Serum bei intrakutaner Einverleibung (0,2—0,3 ccm) das Auslöschphänomen hervorruft, so wird es nach Erhitzen bei 56° im Laufe von 30 Min. und nach dem Zusatz von 0,5 Proz. Phenol in zugeschmolzenen Ampullen in der Kälte aufbewahrt. Steht Pferdeserum (Mosersches),

welches das Auslöschphänomen darbietet, zur Verfügung, so kann auch letzteres an Stelle von menschlichem Serum verwandt werden.

Jeder Kontrollversuch auf Neutralisation des Auslöschphänomens ist auf folgende Weise anzustellen: Es wird die Haut eines Kranken gewählt, der sich im Stadium des zunehmenden Exanthems befindet, und in dieselbe (1. Einstich) mittels einer dünnen Nadel (Nr. 17) 0,2 ccm eines aktiven, mit physiologischer Kochsalzlösung zur Hälfte verdünnten Serums injiziert; in einem Abstand von 4—5 cm (2. Einstich) wird dasselbe unverdünnte Serum, mit dem zu untersuchenden Toxin zu gleichen Teilen vermischt, und nachdem es vorher in Mischung mit letzterem bei 37° 1 Std. lang gestanden hatte, injiziert; an einer dritten Stelle (3. Einstich) wird das mit physiologischer Kochsalzlösung doppelt verdünnte Toxin injiziert. Wenn keine Neutralisation eineingetreten ist, d. h. wenn in der Vakzine keine spezifischen Antigene enthalten sind, so muß an der 2. Einstichstelle das Auslöschphänomen ebenso deutlich ausgeprägt sein, wie an der 1., wo nur Serum allein injiziert worden war; der 3. Einstich dient als Reinantigen-Kontrolle. Wenn aber an der 2. Einstichstelle das Auslöschphänomen nicht aufgetreten ist oder nur in schwächerer Form als an dem 1. Kontrolleinstich, so kann man hieraus auf totale oder partielle Neutralisation des Scharlachantitoxins schließen, d. h. das Antigen ist aktiv. Die Beobachtung des Auslöschphänomens muß 3—4 Std. nach Anstellung der Reaktion begonnen und im Laufe der nächsten 24 Std. fortgesetzt werden.

Die Reaktion beim Kaninchen wird am besten in 2 Tempos vorgenommen: Zuerst wird die Reaktion auf reines, zehnfach verdünntes und bei 100° während 60 Min. erhitztes Filtrat bestimmt (die Haut des Kaninchens wird vorher sorgfältig rasiert). Sowohl das erhitzte wie das nicht erhitzte Filtrat wird intrakutan injiziert. Ist das Antigen aktiv, so ruft es beim Kaninchen (bei Injektion von 0,2 ccm) eine lokale Rötung und ein kleines Infiltrat hervor, die 6—8 Std. nach der Injektion auftreten und 24—36 Std. anhalten. Das erhitzte Antigen gibt uns eine Vorstellung von der Pseudoreaktion, wie bei der Schickschen Reaktion. Dann erst, nachdem wir uns überzeugt haben, daß die Antigenreaktion von den Proteiden unabhängig ist, und daß das Antigen sowohl in reiner als auch in verdünnter Form aktiv ist, machen wir demselben Kaninchen (2. Tempo) auf der anderen Seite mit diesem (nicht erhitzten) Antigen 3 intrakutane Injektionen: die eine mit Antigen, das mit physiologischer Kochsalzlösung um das Doppelte verdünnt ist, die zweite mit einem Gemisch aus Antigen und Serum zu gleichen Teilen, das vorher im Thermostat bei 37° 1 Std. lang gestanden hatte, und die 3. mit aktivem Serum allein, das um das Doppelte verdünnt worden ist.

Tritt Neutralisation des Antigens durch Antiserum ein, so darf an der 2. Stichstelle weder ein Infiltrat noch eine Rötung vorhanden sein, und ein solches Antigen halten wir für aktiv.

Nur die von uns oben angegebenen 3 Methoden der Biokontrolle können wir als die schnellsten und zuverlässigsten empfehlen: sie wurden von uns an einer Reihe von Vakzinen und Kulturfiltraten geprüft und gaben stets die konstantesten Resultate. Wie bereits erwähnt, haben wir den Versuch gemacht, die Untersuchungen der amerikanischen Forscher, welche behaupten, daß die Kulturfiltrate von hämolytischen

Scharlachstreptokokken ein besonders „spezifisches" Toxin enthalten, auf welches sicherlich Scharlachkranke stets positiv reagieren, Genesende selten, für unsere Zwecke auszunutzen. Man sollte meinen, daß eine solch demonstrative Tatsache auch für die Biokontrolle der Vakzine resp. des Kulturfiltrats ausgenutzt werden könnte. Leider hat das von uns nach der amerikanischen Methode gewonnene Toxin nicht diejenigen Resultate gegeben, welche die amerikanischen Autoren erzielt haben, sei es weil wir keinen, einen experimentellen Scharlach beim Menschen hervorrufenden Streptokokkus besaßen, sei es aus irgend einer anderen, rein technischen Ursache. Unser Charkower Toxin gibt, intrakutan einverleibt, die Reaktion einerseits bei Scharlachgenesenden und gibt oft andererseits diese Reaktion nicht bei sicherlich Scharlachkranken. Der Charakter der Reaktion stimmt mit dem überein, was die Amerikaner beschreiben: sie erinnert sehr an die Schicksche Reaktion, nur tritt sie früher auf, nämlich nach 8 Std. und verschwindet bereits am 3. Tage.

Nachdem wir die Vakzine nach der oben angegebenen Methode zubereitet und sie einer Biokontrolle unterzogen hatten, mußten wir noch einen Standard ausarbeiten. Bei der Bestimmung der Vakzinekonzentration gingen wir einerseits von den Angaben über die Konzentration der alten Gabritschevskyschen Vakzine aus, andererseits von dem den Ziffern der amerikanischen Autoren entnommenen N-Gehalt; unsere Vakzine enthält 1000 Millionen Bakterienkörper in 1 ccm und 0,0462 Proz. N, was im Vergleich zur amerikanischen Vakzine eine ganz nahe Stickstoffmenge darstellt.

Was nun die Dosierung anlangt, so haben wir auf Grund der Erfahrung mit der Gabritschevskyschen Vakzine und der Dosierung der Amerikaner folgende Dosis für Erwachsene festgestellt: 0,5 ccm für die 1. Injektion, 1,0 ccm für die 2. und 1,5 ccm für die 3.; für Kinder ist die Dosis nach dem Alter zu modifizieren. Ueber die prophylaktische Wirkung der Charkower Vakzine wird man sich erst dann ein Urteil bilden können, wenn dieselbe an einem großen Material nachgeprüft sein wird, vorläufig kann man nur sagen, daß sie völlig unschädlich ist, wie dies bereits früher hinsichtlich der Gabritschevskyschen Vakzine festgestellt worden ist [siehe meine Arbeit „Ueber die Streptokokkenvakzine bei Scharlach"[1])], und daß die Krankheit bei Geimpften einen leichteren Verlauf nimmt als bei nicht Geimpften.

Indem wir eine solche Vakzine mitteilen, sind wir weit davon entfernt, dieselbe als eine ideale anzusehen, vielmehr kann sie als eine solche nur dann anerkannt werden, wenn wir die Ueberzeugung haben werden, daß wir die Kultur des Scharlacherregers in Händen haben. Vorläufig haben wir nur versucht, eine Vakzine mitzuteilen, die außer dem Scharlachstreptokokkus wenigstens auch noch das Scharlachantigen enthält[2]).

Literatur.

1) Gabritschevsky, G., Die Streptokokkenvakzine und ihre Anwendung beim Scharlach. (Russki Wratsch. 1905. Nr. 30.) — 2) Zingher, Dick test in

1) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 42. 1906. H. 1.

2) Außer den erwähnten Methoden wurde noch folgende eingeführt: die Vakzine wird einem Kinde von 3—5 Jahren subkutan injiziert und diese Injektion nach 5 Tagen wiederholt; die 24—48 Std. nach der 2. Injektion auftretende Eosinophilie spricht für die Spezifität des Virus.

normal persons and in acute and convalescent cases of scarlet fever. (Journ. Americ. Med. Assoc. Vol. 83. 1924. Nr. 6.) — 3) Dick a. Dick, The prevention of scarlet fever. (Ibid. Vol. 83. 1924. Nr. 2.) — 4) Dick, Gladysh, Résumé of the literature in scarlet fever. (Americ. Journ. of Dis. of Children. Vol. 10. 1924.) — 5) Kuczynski, Beobachtungen und Versuche über die Pathogenese der Scarlatina. (Klin. Woch. 1924. Nr. 29.) — 6) Bürgers u. Bachmann, Zur Aetiologie des Scharlachs. (Arch. f. Hyg. Bd. 94. 1924.) — 7) di Cristina, La Pediatria. 1921. 1923. — 8) Caronia, Ibid. 1923 u. D. med. Woch. 1924. — 9) Hoffstaedter, Sowrem. problemi skarlatiny, praktitsch. (Wratsch. 1924. Nr. 6—8.) — 10) Bernhardt, Zur Scharlachätiologie. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Referate. Beiheft zu Bd. 50. 1911.) — 11) Cantacuzène, Inoculation de la scarlatine aux singes inférieures. (Compt. rend. Soc. Biol. 1911.) — 12) Hektoen, L., and Weaver, Exper. of the transmission of scarlet fever to monkey. (Journ. Americ. Assoc. 1911.) — 13) Landsteiner, Levaditi, Prasek, Tentatives de transmission de la scarlatine au chimpanzé. (Compt. rend. Soc. Biol. 1911.)

Zur Serodiagnostik des Skleroms.

[Aus der bakteriologischen Abteilung des Weißrussischen Pasteurschen Instituts (Dir. Prof. B. Elbert) und der Abteilung für Ohren-, Hals- und Nasenkrankheiten d. I. städt. Krankenhauses Minsk (Leiter Dr. med. B. Feldmann).]

Von Prof. **B. Elbert**, Dr. med. **B. Feldmann** u. Dr. **W. Gerkes**.

Die Diagnostik des Rhinoskleroms (nach Wolkowitsch: Scleroma respiratorium) mit Hilfe der gewöhnlichen Immunitätsreaktionen ist ein noch wenig erforschtes Gebiet. Bisher finden sich in der Literatur keine genauen Angaben über den Wert dieser oder jener Immunitätsreaktion für die Serodiagnostik des Rhinoskleroms. Zweifelsohne hat auf die ungenügende Bearbeitung dieser Frage der langandauernde Streit über die ätiologische Bedeutung der Rhinosklerombazillen eine große Wirkung ausgeübt. Jedoch unterliegt heutzutage die spezifische Rolle des bereits 1882 beschriebenen Bazillus Frisch wohl kaum einem Zweifel, besonders nach der ausführlichen Arbeit von Paltauf und Eiselsberg und den Untersuchungen von Stepanow, Pawlowski, Rona, Neumann, Mirbelli, Alvarez u. a., welche das ätiologische Problem des Skleroms vertieft haben.

Bei der Diagnose dieser schweren chronischen (zuerst von Hebra 1870) beschriebenen Erkrankung fällt die Hauptrolle der pathologisch-histologischen Methode zu. Andere diesbezügliche diagnostische (bakteriologische, serologische) Laboratoriumsmethoden haben bisher die Anerkennung in bezug auf Gründlichkeit, Zuverlässigkeit und Einfachheit nicht gefunden.

Lediglich auf Grund des histologischen Bildes (Babes, Pelizzari, Mikulicz, Cornil und Alvarez, Wolkowitsch, Frisch, Mirbelli u. Noyes u. a.) wurde eine sichere Diagnose ermöglicht. Dieses Bild enthält bekanntlich die besonderen charakteristischen Mikuliczschen Zellen und hyalinen Kugeln.

Die weitere Erforschung des histologischen Befundes der Sklerom granulome verdanken wir bekanntlich Pelizzari, Cornil, Dietrich, Unna, Frisch, Mirbelli u. Noyes, Babes, Wolkowitsch und Konstantinowitsch. Die pathologisch-histologische Untersuchung stützt die klinische Diagnostik des Skleroms in demjenigen Stadium der Krankheit, wo schon äußerliche objektive Ver-

änderungen des Gewebes vorhanden sind. Für die Frühdiagnose ist die pathologisch-histologische Methode nicht anwendbar.

Für die Skleromepidemiologie liegt die Hauptbedeutung in einer solchen Methode, welche die Frühdiagnose in einem Stadium, wo weder eine makroskopisch sichtbare Entwicklung der Granulome noch typische mikroskopische Befunde nachweisbar sind, gestattet. Das hat außerdem besonderen Wert bei Massenuntersuchungen für die latenten, im epidemiologischen Sinne gefährlichen Krankheitsfälle. Es ist daher wichtig, festzustellen, wie weit die in der Literatur vorhandenen Angaben über die Spezifität der Serodiagnostik des Rhinoskleroms begründet sind.

Der geeignete Weg hierzu ist die Kontrolle mittels der pathologisch-histologischen Untersuchung. Unsere diesbezüglichen Beobachtungen und Untersuchungen, über welche im Nachfolgenden berichtet werden soll, zeigen, daß wir in der serodiagnostischen Methode tatsächlich ein zuverlässiges Hilfsmittel bei der Diagnose des Rhinoskleroms besitzen.

Die Frage über die Spezifität der serologischen Rhinoskleromdiagnostik war lange Zeit ein Streitobjekt. So studierten zahlreiche Autoren die morphologischen und biologischen Eigenschaften des Rhinosklerombazillus Frisch, des Pneumobazillus Friedländer, des Bacillus mucosus capsulatus, sowie des Ozaenabazillus Löwenberg und suchten mit Hilfe gewöhnlicher Immunitätsreaktionen eine Differenzierung derselben herbeizuführen. Klemperer und Scheier konstatierten beim Immunisieren kleiner Laboratoriumstiere mit Ozaena-, Rhinosklerom- und Diplobazillen Friedländer die Spezifität der erhaltenen Sera gegenüber dem angewandten Antigen.

Aber diese Methode hat sich als sehr schwierig erwiesen, weil die immunisierten Tiere schnell zugrunde gingen. Babes immunisierte mit Hilfe subkutaner Injektionen Meerschweinchen und Kaninchen mit geringen Mengen von Kulturen des Sklerombazillus oder mit dessen Filtrat und fand danach im Serum eine geringe Menge an Agglutininen. Klemperer und Scheier bekamen ein Immunserum geringerer Agglutinationsfähigkeit (1:1 bis 1:100). Dabei fand sich eine Gruppenagglutination mit anderen Kapselbazillen. Sicard erhielt ein Immunserum mit höherem Agglutinationstiter (bis 1:500). Die schwache Agglutination zwischen Immunserum und Rhinosklerombazillus resp. Ozaena- und Pneumobazillus ist, wie nachgewiesen wurde, durch die schlechte Agglutinabilität der Mikroben bedingt, die wiederum von der sie umgebenden eiweißhaltigen Kapsel herrührt. Als man eine mit Salzsäure bearbeitete Mikrobenaufschwemmung mittels Natriumlösung neutralisierte, erhielt man eine Hydrolyse des Eiweißes der Kapsel, und darauf agglutinierten die Mikroben besser (Porges).

In starker Verdünnung klebt das Skleromserum die in oben angegebener Art bearbeiteten Bazillen Frisch zusammen. Dabei konstatiert man eine schwache heterologische Agglutination mit Bazillus Friedländer. Eine praktische Anwendung der Agglutinationsreaktion für die Diagnose des Rhinoskleroms hat wegen ihrer Unbeständigkeit nicht stattgefunden.

Die Methode der Komplementbindung nach Bordet-Gengou ist von Ballner und Reibmayr zur Differenzierung des Friedländerschen Diplobazillus angewendet worden. Diese Autoren konstatierten bei einem Kaninchen, welchem Pneumobazillen einverleibt wurden, die Entstehung komplementbindender Bestandteile im Blutserum und zwar nur gegenüber dem betr. Antigen. Jedoch erzielte man die Komplementbindungsreaktion auch mit anderen Kapselmikroben bei Anwendung von Serum in stärkerer Konzentration. Goldzieher und Neuberg bedienten sich der Methode von Bordet-Gengou zur Rhinosklerom-Diagnose in einem Falle. Diejenigen Untersucher, welche als Antigen eine Emulsion von Sklerombazillen in Aufschwemmung mit

physiologischer Kochsalzlösung oder einem Wasserextrakt von Bazillen benutzten, erzielten eine vollkommene Komplementbindung mit dem Serum des Kranken. Die Kontrolluntersuchung dieser Sera mit Friedländer-Bazillen, resp. Wasserextrakt derselben ergab ein negatives Resultat.

Dieselben Autoren konstatierten nach dreimaliger Einführung von Sklerombazillen-Emulsion (1 ccm in 8tägigen Zwischenräumen) im Serum des Kaninchens komplementbindende Antikörper, und zwar nur gegenüber dem Sklerombazillus. Goldzieher und Neuberg wiesen beim Immunisieren anderer Kaninchen mit dem Friedländer-Bazillus die Entstehung von Antikörpern des Pneumobazillus und das Fehlen von Antikörpern gegen den Frisch-Bazillus nach. Babes beschreibt zwei Rhinoskleromfälle mit positiver Komplemententbindungsreaktion: einen Fall mit weit fortgeschrittenem Prozeß, einen anderen mit unbedeutenden pathologischen Veränderungen.

Die Methode der Komplemententbindung wurde zur Diagnose des Rhinoskleroms auch von Brunner und Jakubowski angewendet. Von russischen Autoren waren es Grinczar, Meszczerski, Joukow, ferner 1922 Togunowa und Kordatowa, welche erneut die Frage der Spezifität der betreffenden Reaktion nachprüften. Die beiden Autoren beschrieben 4 Fälle von Rhinosklerom, bei denen sie ein positives Resultat mit der Komplementbindung erhielten. Bei diesen Autoren gelangten zur Anwendung: das Serum in Dosen von 0,1 ccm; das Komplement in Verdünnung von 1:15 oder dem Titer entsprechend; der hämolytische Ambozeptor in dreifach wirkender Dosis; als Antigen — eine Aufschwemmung einer 24stünd. Sklerombazillenkultur, abgetötet durch Erwärmen im Wasserbade bei 58—60° in einer mit Normalserum austitrierten Dosis.

Der eine von uns (Elbert) begann 1921 eine Arbeit über die Spezifität der Komplementbindungsreaktion bei Rhinosklerom, wobei in 2 von 4 Fällen ein positives Resultat erzielt wurde.

Seit der von Hebra stammenden Beschreibung des Rhinoskleroms besitzen wir eine große Menge von Beobachtungen über die Verbreitung dieser Krankheit und das Vorkommen derselben in verschiedenen Ländergebieten. Das Sklerom ist hauptsächlich in Polen, Galizien, Ungarn, Böhmen, in der Bukowina und in Mähren verbreitet, ferner in den westlichen und südwestlichen Provinzen Rußlands (besonders in den Gouvernements Minsk, Mohilew, Kiew, Podolsk und Wolhynien). Auch in Ostpreußen und Mittelamerika sind Skleromerkrankungen beschrieben worden.

Der Zweck dieser Arbeit ist nicht die Beschreibung der enormen Verbreitung des Skleroms innerhalb Weißrußlands. Doch möchten wir nebenbei darauf hinweisen, daß bereits eine systematische Untersuchung von größeren Bevölkerungsgruppen Weißrußlands vorgenommen wurde. Zu diagnostischen Zwecken wenden wir dabei die serologische Methode der Komplementbindung an.

Die Technik unserer serologischen Untersuchungen auf Rhinosklerom besteht in folgendem: Als Antigen dient eine Kultur des Rhinosklerombazillus[1]). Eine 24stünd. Schrägagarkultur wird mit 5—10 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Die Emulsion wird in ein steriles Reagenzgläschen abgegossen und im Wasserbade bei 60° im Laufe einer Stunde abgetötet. Dann wird die Gebrauchsdosis für den Hauptversuch festgestellt.

Das zu untersuchende Serum wird im Wasserbade $1/2$ Std. lang bei 56° C inaktiviert und bei der Prüfung mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:5 verdünnt. Das Komplement wird gewöhnlich

1) Die erste Kultur wurde uns in liebenswürdiger Weise von Frau D. A. J. Togunowa zur Verfügung gestellt, wofür wir auch an dieser Stelle unseren verbindlichsten Dank aussprechen möchten.

in der Verdünnung von 1:10 genommen; parallel wird ein zweiter Versuch in der Verdünnung 1:8 angestellt.

Das Antigen wird austitriert: 1) in Mischung mit Komplement, 2) in Mischung mit Komplement + 2 bis 3 Normalseren, und 3) in Mischung mit Komplement + Serum eines Skleromkranken.

Die genaue Versuchsanordnung veranschaulichen folgende Tabellen:

Tabelle I.

	Antigen + Komplement											
Sklerombaz.-Emulsion	0,25	0,225	0,2	0,175	0,15	0,125	0,1	0,075	0,05	0,0225	0,01	0,005
Komplement 1:10	je 0,25 in alle Reagenzgläschen											
Phys. NaCl-Lösung	0,25	0,275	0,3	0,325	0,35	0,375	0,4	0,425	0,45	0,475	0,49	0,495
	1 Std. Brutschrank bei 37° C											
5proz. Hammelblutk., sensibil. mit 3facher Amboz.-Dosis	je 0,5 in alle Reagenzgläschen											
Resultat:	c.H.[1]	c.H.	st.L	L.	L.	L.	L.	L.	L.	L.	L.	L.

Tabelle II.

	Antigen + Normalserum + Komplement.											
Sklerombaz.-Emulsion	0,25	0,225	0,2	0,175	0,15	0,125	0,1	0,075	0,05	0,0225	0,01	0,005
Komplement 1:10	je 0,25 in alle Reagenzgläschen											
Inaktiviertes Normalser. 1:5	je 0,25 in alle Reagenzgläschen											
Phys. NaCl-Lösung	—	0,025	0,05	0,075	0,1	0,125	0,15	0,175	0,2	0,225	0,24	0,245
	1 Std. Brutschrank bei 37° C.											
5proz. Hammelblutk., sensibil. mit 3facher Amboz.-Dosis	je 0,5 in alle Reagenzgläschen											
Resultat:	c. H.	beg. L.	st. L.	L.	L.	L.	L.	L.	L.	L.	L.	L.

Tabelle III.

	Antigen + Rhinoskleromserum + Komplement												
Sklerombaz.-Emulsion	0,25	0,225	0,2	0,175	0,15	0,125	0,1	0,075	0,05	0,0375	0,025	0,01	0,0075
Komplement 1:10	e 0,25 in alle Reagenzgläschen												
Serum eines Skleromkr.	je 0,25 in alle Reagenzgläschen												
Phys. NaCl-Lösung	—	0,025	0,05	0,075	0,1	0,125	0,15	0,175	0,2	0,2125	0,225	0,24	0,2425

1) c. H. = komplette Hemmung, beg. L. = beginnende Lösung, st. L. = starke Lösung, L. = komplette Lösung.

	Antigen + Rhinoskleromserum + Komplement											
	1 Std. Brutschrank bei 37° C											
5proz. Hammelblutk., sensibil. mit 3facher Amboz.-Dosis	je 0,5 in alle Reagenzgläschen											
Resultat:	c. H.	c. H.	c. H.	c. H.	c. H.	c. H.	c. H.	c. H.	c. H.	c. H.	c. H.	beg.L.	L.

Da die erste nicht hemmende Antigendose im Gemisch mit Normalserum 0,175 und die kleinste Antigendose für die volle Hemmung der Hämolyse mit Rhinoskleromserum 0,025 betrug, wurde im Hauptversuch als Titerdose 0,075 des Antigens genommen.

Die Resultate unserer serologischen Blutuntersuchungen sind folgende:

Tabelle IV.

Erste Untersuchungsreihe: 5 Blutsera; Antigentitration mit den Seren der Skleromkranken Nr. 2 und 3.

Nr.	Name	Kpltbdg. mit Sklerombazillen	Klinische Diagnose	Pathol.-hist. Diagnose
1	Gurinowitsch	+++	Scleroma? Lues?	θ
2	German	+++	Scler. nasi et laryngis	Skleroma
3	Joltok	++++	dgl.	„
4	Wiktorowitsch	++++	Scleroma? Tbc. laryngis?	θ
5	Normalserum I	—	θ	θ

Tabelle V.

Zweite Untersuchungsreihe: 5 Blutsera; eines von einem Kranken mit klinischer Diagnose „Larynxsklerom“, ferner die Kranken Nr. 1 und 3 (nicht Skleromkranke).

Nr.	Name	Kpltbdg mit Sklerombazillen	WaR.	Klinische Diagnose	Pathol.-hist. Diagnose
6	Gurinowitsch	+++	.	Scleroma? Lues?	θ
7	Letkowsky	++++	.	„ lar.	Scleroma
8	Lues	—	++++	Lues	θ
9	Normalserum II	—	—	θ	θ
10	„ III	—	—	θ	θ

Tabelle VI.

Dritte Untersuchungsreihe: 4 Blutsera; Nr. 11 (klin. Diagnose Nasensklerom), Nr. 12, 13 und 14 (Kontrollen). Kontrolle mit Ozaena- und Friedländer-Bakterien.

Nr.	Name	Komplementbindung mit			WaR.	Pathol.-hist. Diagnose
		Sklerombazillen	Ozaenabazillen	Friedl.-Bazillen		
11	Olechnowitsch	++++	—	—	—	Scleroma
12	Normalserum IV	—	—	—	—	θ
13	Luesserum	—	—	—	++++	θ
14	Normalserum V	—	—	—	—	θ

Ein positiver Ausfall wurde also nur mit dem Sklerombazillenantigen bei typischem Sklerom erhalten, mit Ozaena- bzw. Friedländer-Bazillen dagegen nicht.

Tabelle VII.

Vierte Untersuchungsreihe: 54 Blutsera: 44 davon stammten von Bauern aus den Dörfern Griwa und Dukorsczina (Kreis Minsk). Das Antigen wurde mit 2 Seren von Kranken, die aus diesen Dörfern stammten, mit feststehender Skleromdiagnose titriert. Alsdann erfolgte der Hauptversuch.

Nr.	Name	Komplementbindung mit Sklerombazillen	Klinische Diagnose	Pathologisch-histologische Diagnose
15	Katjuszik Fedora	++++	Scleroma nasi et laryng.	Scleroma
16	„ Grigor	—	θ	θ
17	„ Nadia	—	θ	θ
18	„ Wasily	—	Rhinitis cat.	θ
19	„ Feodor	—	„ atroph.	θ
20	„ Marie	—	Pharyng. sicca	θ
21	„ Wasilissa	++++	Scleroma nasi	θ
22	Sigmantowitsch Irina	+++	Rhinitis ant.	θ
23	„ Charit.	—	Laryng. post.	θ
24	„ Tit.	—	θ	.
25	„ Ksenia	—	Tbc. pulmon. Diphtheria	.
26	„ Ekaterina	—	θ	.
27	„ Nadia	—	θ	.
28	„ Marie	—	Laryng. hyperpl.	.
29	„ Peter	—	θ	.
30	„ Leon	—	θ	.
31	„ Ust.	—	Ozaena	.
32	„ Just.	+	θ	.
33	Mikulzik Natalia	+++	Scleroma nasi	.
34	„ Nastia	++++	„ „ et laryng.	.
35	„ Magd.	—	Rhinitis ant.	.
36	„ Matr.	—	„ „	.
37	Gubar Semion	++++	Ozaena?	.
38	„ Marie	—	θ	.
39	Kalita Marie	—	Rhinitis atroph.	.
40	Jakowley Feodor	—	Laryng. chronica	.
41	Gretzik Anastasie	—	θ	.
42	Onetzik Nastasia	+++	?	.
43	Gnetzik Flor	—	Rhinitis cat.	.
44	Kalita Michael	—	Laryngitis	.
45	„ Natalie	—	θ	.
46	„ Andrej	—	θ	.
47	„ Marie	—	Rhinitis et Phar. atroph.	.
48	Czernik Iwan	—	„ „ „ „	.
49	Golubowitsch Peter	—	Rhinitis	.
50	Andrejzik N.	—	„	.
51	Golubowitsch Pelag.	—	„	.
52	Tolkatsch Elisabeth	—	θ	.
53	Rabzenak Marie	—	Phar. sicca	.
54	Andrejzik J.	—	Rhinitis et Phar.	.
55	Czernik Praskowia	—	θ	.
56	Golubowitsch Peter	—	θ	.
57	Sitnik Alexander	—	Rhinitis atroph.	.
58	Andrejzik Was.	—	„ cat.	.
59	Czernik Christ.	—	θ	.

Tabelle VIII.

Als Kontrolle dienten 10 Blutsera, die der bakter. Abteilung zur Ausführung der WaR. überwiesen waren. Alle diese Sera ergaben mit der Rhinsokleromkultur einen negativen Ausfall der Komplementbindungsreaktion. Der 4. Versuch wurde derart wiederholt, daß die positiv reagierenden Seren mit Sklerom-, Ozaena- und Friedländer-Bazillen vermengt wurden. Zu diesem Versuch gehörten ein Serum von einem Patienten mit der Diagnose Tbc. nasi und 3 andere Sera.

Nr.	Nr. des Serums	Komplementbindung mit		
		Sklerom-bazillen	Ozaena-bazillen	Friedländer-Bazillen
60	22	+++	—	—
61	37	++++	—	—
62	33	++++	—	—
63	42	++++	—	—
64	21	++++	—	—
65	Normalserum VI	—	—	—
66	Behandelte Lues	—	—	—
67	Normalserum VII	—	—	—
68	Tbc. nasi	—	—	—

Tabelle IX.

Fünfte Versuchsreihe: 2 Sera von Patienten mit klinischer Skleromdiagnose, ein Serum des Mannes einer Skleromkranken und 10 Kontrollsera.

Nr.	Name	Komplementbindung mit Sklerombazillen	WaR.	Klinische Diagnose
69	Makarewitsch Feodora	++++	—	Scleroma laryngis
70	„ Sawwa	—	—	Sanus
71	Zwirko Lubow	++++	—	Scleroma
72	Kontrollsera 6365	—	—	.
73	„ 6346	—	—	.
74	„ 6330	—	—	.
75	„ 6372	—	++++	.
76	„ 6313	—	++++	.
77	„ 6319	—	—	.
78	„ 6354	—	—	.
79	„ m 1	—	++++	.
80	„ m 2	—	++++	.
81	„ 6360	—	++++	.

Die Versuche mit den Blutseren Nr. 69 und 71 wurden auch nach der Quantitätsmethode von Kaup angestellt. Dabei wurde in beiden Fällen eine Hemmung der Hämolyse mit einer und mehreren Komplementdosen gefunden.

Tabelle X.

Sechste Untersuchungsreihe: Blutsera, die von Bauern der Dörfer Kobilitschi und Chozaniczki stammten, 2 Blutsera von Patienten mit klinischer Skleromdiagnose. Die Antigentitrationen wurden mit Blutserum der Skleromkranken Nr. 1, 69 und 71 angestellt.

Nr.	Name	Komplementbindung mit Sklerombazillen	Klinische Diagnose
1	Gurinowitsch	++++	Scleroma
69	Makarewitsch Feodora	++++	„
71	Zwirko Lubow	++++	„

No.	Name	Komplementbindung mit Sklerombazillen	Klinische Diagnose
82	Aleitschik A.	—	Rhinitis et Pharyng. sicca
83	Solowei Ewa	—	„ „ „ atr.
84	Bakuntschik M.	—	„ „ „ „
85	Bistrik Leon	—	θ
86	„ Genia	—	θ
87	„ Anastasia	—	θ
88	„ Kostia	—	θ
89	Ageitschik Af.	—	Rhinitis atroph.
90	Solowei Aks.	—	θ
91	„ P.	—	θ
92	„ W.	—	θ
93	German Al.	—	Rhinitis atroph.
94	Punickaja M.	—	Pharyng. sicca
95	Ageitschik G.	—	Rhinitis et Pharyng. cat.
96	Kursik Z.	—	θ
97	„ N.	—	Rhinitis et Pharyng. cat.
98	„ P.	—	θ
99	„ G.	—	θ
100	„ Igor	++++	Rhinitis atroph.
101	„ E.	—	θ
102	„ O.	—	Pharyng. sicca
103	„ N.	—	θ
104	„ S.	—	Laryng. cat.
105	„ S.	—	θ
106	Bitus	—	θ
107	Labus	—	Pharyng. sicca
108	Bulango	++++	Scleroma laryngis
109	Goriatschko E.	++++	„ nasi

Kontrollen mit Blutseren, die der bakteriologischen Abteilung für die WaR. überwiesen waren:

Nr.	Nr. der WaR.	Kpltbdg. mit Sklerombaz.	WaR.	Nr.	Nr. der WaR.	Kpltbdg. mit Sklerombaz.	WaR.
110	6553	—	—	115	6585	—	—
111	6601	—	—	116	6583	—	—
112	6592	—	—	117	6571	—	++++
113	6584	—	++++	118	6602	—	—
114	6572	—	++++	119	6587	—	++++

Tabelle XI.

Siebente Untersuchungsreihe: 1 Blutserum des Patienten Sulzitz mit klinischer Skleromdiagnose, als Kontrollen Nr. 108 und 5 Normalsera.

Nr.	Name	Komplementbindung mit Sklerombazillen	Klinische Diagnose
120	Sulzitz	++++	Scleroma
121	Nr. 108	++++	Scleroma laryngis
122	Normalserum VIII	—	.
123	„ IX	—	.
124	„ X	—	.
125	„ XI	—	.
126	„ XII	—	.

Tabelle XII.

Achte Untersuchungsreihe: das Blutserum des Patienten Kopa... ...en, als Kontrollen das Blutserum des Patienten Sulzitz (Nr. 120) und 4 Normalsera.

Nr.	Name	Komplementbindung mit Sklerombazillen	Klinische Di...nose
127	Kopazewitsch	—	Scleroma
128	Nr. 120	++++	Scleroma
129	Normalserum XIII	—	.
130	„ XIV	—	.
131	„ XV	—	.
132	„ XVI	—	.

Tabelle XIII.

In folgender tabellarischer Zusammenstellung sind die Resultate sämtlicher Versuchsreihen der Komplementbindungsreaktion in vergleichender Weise dargestellt: 13 Fälle, bei denen die Komplementbindungsreaktion der klinischen Diagnose entsprach und zum Teil durch den pathol.-histol. Befund sichergestellt wurde.

Nr.	Name	Komplementbindung mit Sklerombazillen	Klinische Diagnose	Pathol.-hist. Diagnose
1	German	++++	Scleroma nasi et lar.	+
2	Seltok	++++	„ „ „ „	+
3	Letkowsky	++++	„ „ „ „	fehlt
4	Olechnowitsch	++++	„ „ „ „	+
5	Katijustschik F.	++++	„ „ „ „	.+
6	„ W.	++++	„ „ „ „	fehlt
7	Mikulzik N.	++++	„ „ „ „	„
8	„ Nastia	++++	„ „ „ „	+
9	Makarewitsch F.	++++	„ „ „ „	fehlt
10	Zwirko L.	++++	„ „ „ „	„
11	Bulango	++++	„ „ „ „	„
12	Goriatschko E.	++++	„ „ „ „	„
13	Sulzitz	++++	„ „ „ „	„
1 Fall, bei dem die klinische Diagnose zwischen Sklerom und Lues schwankte:				
14	Gurinowitsch	++++	Sklerom? Lues?	fehlt
1 Fall, bei dem die klinische Diagnose zwischen Sklerom und Tuberkulose schwankte:				
15	Wiktorowitsch	++++	Sklerom? Tbc.?	fehlt

Fälle mit sonstigen klinischen Diagnosen:

Nr.	Name	Komplementbindung mit Sklerombazillen	Klinische Diagnose
16	Sigmantowitsch J.	++++	Rhinitis ant.
17	Gubar S.	++++	Ozaena?
18	Onetschik N.	++++	?
19	Sigmantowitsch A.	+	?
20	Kursik Igor	++++	Rhinitis atroph.

Endlich lautete in einem Falle (Nr. 127) die Wahrscheinlichkeitsdiagnose Sklerom, während die Komplementbindungsreaktion ein negatives Resultat ergab. Die Beobachtung der Patientin wird fortgesetzt.

Zusammenfassung.

Aus den dargestellten Untersuchungen geht hervor, daß die Komplementbindungsreaktion mit der von uns beschriebenen Technik eine überaus wichtige und zuverlässige Methode für die Serodiagnostik des Rhinoskleroms darstellt.

Literatur.

Alvarez, Arch. de Phys. norm. et path. 1886. — Babes u. Schwimmer, Das Rhinosklerom, in Ziemssen, Handb. d. spez. Pathol. u. Therapie. 1884. — Cornil, Progr. méd. 1883. Nr. 30. — Cornil et Alvarez, Arch. de Phys. norm. et path. 1885. — Dietrich, Ztschr. f. Heilk. Bd. 8. 1887. — v. Frisch, Wien. med. Woch. 1882. Nr. 32. — Goldzieher u. Neuberg, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 51. H. 21. — Hebra, Wien. med. Woch. 1870. Nr. 11. — Joukoff, Diss. St. Petersburg 1910 (russisch). — Kedrowsky, in Zlatogoroffs Handb. Petersburg. — Klemperer u. Scheier, Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 45. 1902. — Konstantinowicz, Virch. Arch. Bd. 167. 1902. — Mirbelli, Monatsschr. f. prakt. Derm. Bd. 12. 1889. — Mikulicz, Arch. f. Chir. Bd. 20. 1876. — Neumann, Zeitschr. f. Hyg. 1902. — Noyes, Monatsschr. f. prakt. Derm. Bd. 10. 1890. — Paltauf u. Eiselsberg, Fortschr. d. Med. 1886. — Pawlowsky, Intern. med. Kongr. Berlin 1890. — Pellizarri, zit. n. Babes in Kolle-Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg. Bd. 5. 1913. — Rona, Arch. f. Dermat. Bd. 49. 1900. — Stepanow, Monatsschr. f. Ohrenheilk. 1889 und Diss. St. Petersburg 1905 (russisch). — Togounowa u. Kordatowa, Arch. f. klin. u. exper. Med. Moskau. 1922. — Unna, Histo-Pathologie d. Hautkr. 1894. — Wolkowitsch, Centralbl. f. med. Wissensch. 1886. Nr. 17 u. Diss. Kiew 1886 (russisch).

Zur Differentialdiagnose von Milzbrand und milzbrandähnlichen Sporenträgern mittels bluthaltiger Nährböden.

[Aus dem Institut für Hygiene und Bakteriologie der Universität Bonn (damaliger stellvertretender Direktor: Prof. Dr. F. W. Bach).]

Von Dr. med. **A. Hallermann,**

früherem Assistenten des hygienischen Instituts.

Für die Differentialdiagnose zwischen echten Milzbrandbazillen und milzbrandähnlichen Keimen ist von Wagner 1923 (12) als eines der sichersten Hilfsmittel die Prüfung der betreffenden Kulturen auf der Blutagarplatte empfohlen worden: hämolytische, oder besser gesagt, hämopeptische Eigenschaften sollen nur den milzbrandähnlichen Keimen zukommen, dem echten Milzbrand dagegen fehlen. Sogar dem Tierversuche soll die Prüfung auf der Blutplatte überlegen sein.

Wagner beruft sich bei seinen Angaben auf im Prinzip gleiche Befunde von Jarmai (6), der das verschiedene Verhalten von echtem Milzbrand und milzbrandähnlichen Stämmen gegenüber Blut ebenfalls als ein praktisch wertvolles diagnostisches Hilfsmittel verwertet wissen will.

Jarmai (6) prüfte seine Stämme in Blutbouillon (Zusatz von 20 Proz. defibriniertem Hammel- oder Pferdeblut) sowie auf Agarplatten mit 25 Proz. Blutzusatz. Nach 16stünd. Bebrütung bei 37° C erfolgte bei virulenten und leicht abgeschwächten Milzbrandstämmen keine Spur von Blutauflösung, im Gegensatz zu den bis zum Verluste ihrer Virulenz abgeschwächten Milzbrandstämmen und den Milzbrandähnlichen. Immerhin gibt Jarmai an, daß den echten virulenten und leicht abgeschwächten Milzbrandstämmen ein schwaches, in Blutbouillon frühestens nach 4 Tagen, auf der Blutagarplatte frühestens nach 48 Std. mit bloßem Auge erkennbares Hämolysierungsvermögen zukomme. Auf der Blutagarplatte trat dabei zwar kein scharf umschriebener, farbloser Hof wie bei den Milzbrandähnlichen auf, sondern es zeigte sich nach 48 Std. nur eine unerhebliche diffuse Aufhellung des Nährbodens unter der Kolonie und um dieselbe herum. Nach Jarmais Auffassung soll die Kapsel des virulenten Milzbrandes eine die Hämolyse hemmende Rolle spielen.

Uemura (11) bestätigt im allgemeinen die Angaben Jarmais, auch er hält den Unterschied zwischen Milzbrand und Milzbrandähnlichen für sehr prägnant und differentialdiagnostisch brauchbar, betont aber, daß nur eine gewisse Zeit hindurch der Untershiced erkennbar sei, da er nach 48 Std. auch bei echtem Milzbrande eine diffuse, aber nicht eine zu einer scharfen Hofbildung führende Hämolyse erkannt habe.

Im Gegensatz zu Jarmai beobachtete Bail (2), daß ein durch Einwirkung hoher Temperaturen (4stünd. Erhitzung auf 48—49° C) künstlich avirulent und kapsellos gewordener Milzbrand sich in den Blutnährmedien vollkommen gleich wie der virulente bekapselte Ausgangsstamm verhielt. Eine „diffuse, weitverbreitete Auflösung der Blutzellen" nach 48 Std., aber ohne Bildung scharf umschriebener heller Höfe wird von Bail für Milzbrand angegeben.

Baerthlein (1) bestreitet auf Grund seiner an 11 Milzbrandstämmen und 12 Pseudomilzbrandstämmen gemachten Beobachtungen die Brauchbarkeit der Blutagarplatte als differentialdiagnostisches Hilfsmittel, da seine Pseudomilzbrandstämme sich nicht prinzipiell von den echten Milzbrandstämmen unterschieden.

Den Angaben von Sobernheim (10), v. Wunschheim (13), M. v. Krogh (8) zufolge kommt dem Milzbrand blutlösende Fähigkeit zu, auch Heyrovsky u. Landsteiner (5) fanden ein schwach wirkendes Hämolysin beim Milzbrand, im Gegensatz zu einem stark wirkenden der apathogenen Sporenträger.

Die verschiedenen, nicht immer übereinstimmenden Angaben für das Verhalten der Milzbrandbazillen und milzbrandähnlichen Keime gegenüber bluthaltigen Nährböden ließen somit eine Nachprüfung angezeigt erscheinen. Insbesondere scheint bei einer Gegenüberstellung der verschiedenen Mitteilungen hervorzugehen, daß zum mindesten Zeitpunkt und Grad der eintretenden Hämolyse, auf denen als maßgebender Grundlage die Unterscheidung zwischen Milzbrand und milzbrandähnlichen beruht, genauerer Festlegung bedürfen. Außerdem ist das Verhalten der durch mannigfache Einflüsse in der Pathogenität mehr oder weniger bis zum völligen Verluste dieser Eigenschaft abgeschwächten Stämme (wie alte Laboratoriumsstämme) nicht immer hinreichend berücksichtigt.

Zu meinen Untersuchungen standen mir insgesamt 10 echte Milzbrandstämme, 1 als solcher benannter Pseudomilzbrandstamm sowie 2 ursprünglich als Milzbrand bezeichnete Stämme zur Verfügung. Zum Vergleich verwandte ich außerdem einen typischen Stamm vom Bac. mesentericus.

Die Milzbrandstämme verhielten sich morphologisch und biologisch als typische Stämme (auf Agar oberflächlich Lockenbildung, im Gelatinestich feiner oder borstiger Haarbesatz, Bouillon nicht getrübt, keine Eigenbewegung, Sporenbildung vorhanden, Tod weißer Mäuse bei subkutaner Impfung nach 1—2 Tagen, im Herzblut typische Milzbrandbazillen mit Kapseln).

Der Pseudomilzbrand wuchs auf Agar wie der echte Milzbrand, im Gelatinestich wie Bac. mesentericus mit entsprechender Verflüssigung und Häutchenbildung, trübte Bouillon mäßig, zeigte aber keine Eigenbewegung.

Die 2 ursprünglich als Milzbrand bezeichneten Stämme wuchsen auf Agar mesentericusähnlich, im Gelatinestich verästelt wie Milzbrand, trübten die Bouillon mäßig, zeigten ebenfalls keine Eigenbewegung.

Diese beiden Stämme sowie der Pseudomilzbrand waren für weiße Mäuse bei subkutaner Impfung apathogen.

Um auch geringfügige Blutlösungen mit möglichster Sicherheit erkennen zu können, wählte ich für die Blutagarplatte und für die Blutbouillon eine Konzentration von 5 % und 10 % defibriniertem gewaschenen, sterilem Hammelblut. Nach 16, 24, 36 und 48 Std. Bebrütung bei 37° C wurde Grad und Charakter der jeweiligen Blutlösung festgestellt.

1. Nach 16stünd. Bebrütung war auf den Blutagarplatten der virulenten Milzbrandstämme keine Spur von Hämolyse zu sehen. Der Rand der 3—5 mm im Durchmesser breiten Punkt- und Strichkolonien ging in den unverändert gebliebenen roten Farbton des Blutagars über. Dagegen war um diese Zeit bei den Kulturen der Milzbrandähnlichen und des Mesentericus der Blutfarbstoff unter der Kolonie und rings um sie nicht nur vollständig aufgehellt, sondern es erstreckte sich auch um die Kolonie ein 2—3 mm breiter, bzw. bei Mesentericus sogar 5 mm breiter ringförmiger, scharfrandig abgesetzter, völlig durchsichtiger Hof. Nach 24 Std. begann aber auch unter den Milzbrandkolonien eine ganz schwache diffuse Aufhellung sich zu zeigen, welche den Rand der Kolonie nicht überschritt. Die Höfe der Milzbrandähnlichen wie des Mesentericus waren um diese Zeit schon 3—5 mm breit und darüber hinaus noch von einer 1—3 mm breiten aufgehellten Zone umgeben. Nach 36 Std. hatte sich das aufgehellte Feld unter der Milzbrandkultur über den äußeren Rand hinaus geschoben und bildete somit um die Kolonie einen 1—2 mm breiten diffus in das umgebende Medium übergehenden, transparenten Ring, der sich in den nächsten 12 Std. noch etwas erweiterte. Die durchsichtigen Höfe der Milzbrandähnlichen und des Mesentericus hatten um diese Zeit einen Durchmesser von 4 bis 8 mm und mehr erreicht.

In Parallelversuchen mit 10 Proz. Blutzusatz verzögerte sich nur der zeitliche Beginn und die Entwicklung der mit bloßem Auge erkennbaren Hämolyse.

2. Anschließend an das Plattenverfahren verfolgte ich meine Stämme in einer 5proz. Blutbouillon. Die alkalische Reaktion der Bouillon entsprach einem pH von 7,8, da auf Grund einer Reihe von vergleichenden Versuchen mit Hilfe der pH-Bestimmung nach Michaelis für meine sämtlichen Stämme das Wachstumsoptimum in einer Nährbouillon von 7,8—8,0 pH lag, entsprechend den Angaben von Bonarcorsi (3).

Die mit annähernd gleichen Mengen frischen Kulturmaterials beimpften Röhrchen zu 10 ccm 5proz. Blutbouillon wurden während des Aufenthaltes im Brutschranke öfter durchgeschüttelt. In einer weiteren Versuchsreihe setzte ich jedem beimpften Röhrchen noch 1 ccm aktives Hammelserum zu.

Nach 16—24 Std. waren die mit Mesentericus und Milzbrandähnlichen beimpften Blutröhrchen nahezu vollständig gelöst, bei den Milzbrandstämmen trat die erste sichtbare Lösung erst kurz vor oder in der 36. Std., oft sogar erst nach 48—72 Std. ein. Aktives Serum der gleichen Tierart wirkte bei allen Stämmen deutlich hemmend.

Bei sämtlichen Versuchen habe ich nur 24stünd., frisch überimpfte Stämme verwandt. Um festzustellen, inwieweit das Hämolysierungsvermögen vom Alter einer Kultur beeinflußt sein könnte, setzte ich 1—14tägigen Bouillonkulturen meines gut hämolysierenden Mesentericus-Stammes je 2 Tropfen einer (gewaschenen) Hammelblut-

körperchenaufschwemmung zu. Es zeigte sich, daß bei den 1tägigen Kulturen die Lösung nach 12 Min. nahezu vollendet war, bei 3- und 4tägigen Kulturen nach 15—20 Min., bei 10tägigen Kulturen begann eine Lösung erst nach 20 Min. und war nach 40 Min. nahezu vollständig. Eine 3 Monate alte Mesentericuskultur wirkte, soweit es mit bloßem Auge zu erkennen war, nicht mehr lösend.

3. In weiteren Versuchen bin ich der bereits von Jarmai (6) und Uemura (11) erörterten Frage nachgegangen, ob, ehemals typische, aber in ihrer Virulenz geschwächte Milzbrandstämme sich hinsichtlich ihrer blutlösenden Eigenschaften anders verhalten als virulente. Jarmai hatte beobachtet, daß avirulent gewordene Milzbrandstämme, welchen z. B. das Kapselbildungsvermögen im Tierkörper und in inaktiviertem Pferdeserum verloren gegangen war, sich den Milzbrandähnlichen ähnlich verhielten, da seine apathogenen Milzbrandstämme fast wie diese hämolysierten.

Da mir für meine Versuche ein natürlich abgeschwächter Milzbrandstamm nicht zur Verfügung stand, suchte ich eine Abschwächung künstlich zu erreichen.

Mit Hilfe des von Koch, Gaffky u. Loeffler (7) angegebenen, von Bail wieder aufgegriffenen Verfahrens durch kurze Einwirkung höherer Temperaturen ließen sich meine Milzbrandstämme (2—4stünd. Erhitzung auf 48° C) nicht dahin verändern, daß eine Hämolyse auf der Blutplatte und in der Blutbouillon eher und stärker auftrat. Auch Bail (2), dem es durch dieses Verfahren gelungen war, einen kapsellosen, nicht mehr infektiösen Milzbrandstamm zu erhalten, sah keine Veränderung des hämolytischen Verhaltens.

Das von Pasteur (9) angegebene Verfahren der Virulenzabschwächung führte ebenfalls zu keinem anderen Ergebnis. Drei 6 Wochen lang unter ständiger Einwirkung einer Temperatur von 43° C alle 2—3 Tage weitergezüchtete Milzbrandstämme änderten weder in der 10. noch in der 15. Generation ihren Charakter.

Auch 24stünd. Einwirkung von schwachen Formalindämpfen ließ die Stämme unbeeinflußt.

Einen Erfolg hatte ich dagegen, als ich, nach Analogie der Versuche von Hetsch (4) mit Pestbakterien, 4 meiner virulenten Milzbrandstämme in Alkoholbouillon züchtete. Geringe Konzentrationen von 0,1 bis 2,0 Proz. Alkohol absol. ließen sie unbeeinflußt, erst in 5, 10, 15 und 20proz. Alkoholbouillon traten deutliche Unterschiede auf. Vom Bodensatz der mit je 1 Oese Kulturmaterial beimpften einzelnen Alkoholbouillonreihen wurde nach 24stünd. Bebrütung bei 37° C die 5proz. Blutplatte beimpft. Um eine Nachwirkung des Alkohols ganz auszuschließen (die Alkoholbouillon allein veränderte zwar die Blutplatte in keiner Weise), impfte ich von den ersten Kolonien am 2. Tage auf eine weitere Plattenreihe über.

Von den unter dem Einflusse des Alkohols gezüchteten Stämmen ließen auf der Blutplatte 3 gegenüber den Ausgangsstämmen deutlich erkennen, daß eine Blutlösung um ca. 6 Std. früher einsetzte und daß später, d. h. nach 1—2tägiger Bebrütung, die Bildung durchsichtiger Höfe auftrat. Nach 16 Std. bereits war eine diffuse Aufhellung unter den Kolonien zu beobachten. In 24 Std. war bei 3 Stämmen eine 1 mm breite, stark aufgehellte Zone oder auch ein scharfrandiger völlig durchsichtiger Hof entstanden, nach 36 Std. von 2—3 mm Ausdehnung, ganz ähnlich wie bei dem Mesentericusstamm. Nur bei einem der Milzbrandstämme trat keine so in die Augen springende Veränderung hervor.

Diese Ergebnisse waren bei Verwendung von 5, 10, 15 und 20proz. Alkoholbouillon nahezu gleich. Die Virulenz aber war bei allen Stämmen trotz der Einwirkung des Alkohols für weiße Mäuse erhalten geblieben.

Zusammenfassung.

Die Angaben von Wagner über das Verhalten von Milzbrandbazillen und milzbrandähnlichen Bazillen auf bluthaltigen Agarnährböden können insofern bestätigt werden, als echter Milzbrand beim Wachstum auf Blutnährböden (Blutagarplatte und Blutbouillon) nur schwache blutauflösende Eigenschaften zeigt. Milzbrand macht die Blutplatte in der Umgebung seiner Kolonie nur transparent, während milzbrandähnliche und verwandte apathogene Sporenträger dagegen auf Blutnährböden das Blut schneller und kräftiger lösen. Sie bilden auf der Blutplatte breite, scharf abgesetzte völlig durchsichtige Höfe.

Die Unterschiede zwischen echten Milzbrandbazillen einerseits und Milzbrandähnlichen sowie nahestehenden Sporenträgern (wie Bac. mesentericus) andererseits treten am deutlichsten zutage nach 16 bis 24stünd. Bebrütung auf der 5proz. Blutagarplatte. Nach 16 Std. haben die letzteren bereits starke hämolytische Höfe gebildet, Milzbrand dagegen nicht. Nach 36stünd. Bebrütung verwischen sich die Unterschiede, wenn auch bei Milzbrand nur eine transparente, unscharf begrenzte Aufhellung zu beobachten ist, im Gegensatz zu den scharf begrenzten vollständig aufgehellten Zonen bei Milzbrandähnlichen und Bac. mesentericus.

Auf den zeitlichen Ablauf der Blutlösungsvorgänge ist größtes Gewicht zu legen. Aus der Nichtbeachtung dieser Verhältnisse erklären sich vermutlich zum Teil auch jene Angaben (Baerthlein, Krogh, Sobernheim u. a.), die dem Milzbrand blutlösende Eigenschaften zuschreiben.

Vor einer Ueberschätzung der Blutagarkultur dürfte jedoch zu warnen sein. Denn durch Züchtung in Alkoholbouillon gelingt es, ursprünglich schwach blutlösende echte Milzbrandstämme in stärker blutlösende umzuwandeln, so daß sie in ihren äußeren Erscheinungen sich mehr den saprophytischen Sporenträgern nähern, dagegen braucht aber ein Verlust der Virulenz nicht einzutreten. Es ist daher nicht von der Hand zu weisen, daß auch unter natürlichen Verhältnissen ähnliche Veränderungen auftreten können, so daß die Abgrenzung des echten Milzbrandes von den milzbrandähnlichen Sporenträgern nicht allein mit Hilfe der Blutagarplatte möglich ist.

Literatur.

1) Baerthlein, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 74. 1914. S. 201. — 2) Bail, Ibid. Abt. I. Orig. Bd. 75. 1915. S. 159. — 3) Bonacorsi, Ztschr. f. Hyg. Bd. 99. 1923. S. 287. — 4) Hetsch, Ibid. Bd. 48. 1904. S. 442. — 5) Heyrowsky u. Landsteiner, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 44. 1907. S. 150. — 6) Jarmai, Ibid. Abt. I. Orig. Bd. 70. 1913. S. 72. — 7) Koch,

Gaffky u. Loeffler, zit. bei Sobernheim i. Kolle-Wassermann, Handbuch d. pathog. Mikroorg. Bd. 3. S. 627. — 8) M. v. Krogh, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 54. 1910. S. 188. — 9) Pasteur, zit. bei Sobernheim in Kolle-Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. Bd. 3. S. 627. — 10) Sobernheim, Kolle-Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg. Bd. 3. S. 583. — 11) Uemura, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 75. 1915. S. 21. — 12) Wagner, Ibid. Abt. I. Orig. Bd. 90. 1923. S. 433. — 13) v. Wunschheim, Arch. f. Hyg. Bd. 54. 1905. S. 185.

Ueber die Kultivierung mariner Spirochäten mit einigen Bemerkungen zur Züchtung der Spirochaeta Obermeieri.

[Aus der Bakteriologischen Abteilung des Reichsgesundheitsamtes.]

Von **Margarete Zuelzer.**

In früheren Arbeiten wurde vom Vorkommen von Spirochäten, insbesondere von Spirochaeta icterogenes im Süßwasser und über deren Züchtung berichtet. Auch im Salzwasser wurden Spirochäten nachgewiesen, und zwar im Mittelmeer, in der Nordsee und in dem Arterner Solgraben. Im Meere sind sie weit verbreitet und leben hier unter den gleichen biologischen Bedingungen wie im Süßwasser. Sie flottieren nie frei im Wasser, sondern kriechen stets auf einer Unterlage. Sie sind typische, stark mesosaprobe Organismen, d. h. sie leben nie in stinkender Fäulnis; erst nachdem die ersten stürmischen Stadien der biologischen Selbstreinigung abgelaufen sind, treten die Spirochäten in der freien Natur auf. Ganz besonders da, wo im fäulnisfähigen schwarzen Schlamme des Meerwassers bei der Zersetzung von Proteinkörpern Schwefelwasserstoff entsteht, kann man meist ziemlich sicher auf das Vorhandensein von Spirochäten rechnen, obgleich die Wasserspirochäten weder strenge Anaërobier sind noch Schwefel speichern.

Sind also die natürlichen Lebensbedingungen der marinen und der Süßwasserspirochäten im wesentlichen die gleichen, so ist dagegen ihr kulturelles Verhalten trotzdem ein verschiedenes. Es ist deshalb vielleicht von Interesse, einige Erfahrungen mitzuteilen, die bei der ersten Züchtung von marinen Spirochäten gemacht worden sind.

Zur Anreicherung sowohl der Süßwasser- als auch der Meerwasserspirochäten brachte ich zunächst spirochätenhaltigen Schlamm in weite Weck- oder Rexgläser, in die gleichen, welche zum Sterilisieren von Obst und Gemüse verwendet werden. Es wird etwa $^4/_5$ Schlamm in die Gläser gefüllt und $^1/_5$ Wasser von der gleichen Oertlichkeit, von der der Schlamm stammt. Dann wird die Oberfläche des Schlammes mit Deckgläsern belegt und das Glas mit Gummiring und Klammer fest verschlossen. Nach 24—48 Stunden haben sich viele Spirochäten auf den Deckgläsern angesammelt. Von diesen wird dann das Material für die Anlage von Kulturen unter mikroskopischer Kontrolle entnommen.

Das üppigste Wachstum von Spirochaeta icterogenes aus dem süßen Wasser wird in mit sterilem Leitungswasser stark verdünntem (1:10) inaktiviertem Kaninchenserum nach Ungermann bei ca. 22—25° erzielt. (Bei gewöhnlicher Zimmertemperatur kann man die Kulturen zweckmäßig auf den 37°-Brutschrank stellen.) In solchen Kulturen findet eine lebhafte Vermehrung der Spirochäten statt. Man kann die Kulturen 1—2mal wöchentlich überimpfen, und es hat sich in dieser Zeit die Keimzahl jeweils vervier- bis versechsfacht. Die Reinigung der Begleitbakterien gelingt in üppigen Spirochätenkulturen nicht selten schon durch Ausfrieren, wobei die Bakterien zugrunde gehen, ein Teil der Spirochäten jedoch das Ausfrieren übersteht. Auch durch Filtration lassen sich Spirochätenkulturen reinigen. An der Wasseroberfläche bildet sich meist eine Bakterienhaut, die bei Reinigungsversuchen regelmäßig entfernt werden muß. — Die Süßwasserspirochäten durchsetzen das Röhrchen ziemlich gleichmäßig; nur die toten oder unbeweglichen Exemplare sinken zu Boden.

Bei meinen Züchtungsversuchen mit Spirochäten aus Schlammproben aus dem Meere bei Helgoland, welche einer Virulenzsteigerung und -prüfung dieser Spirochäten dienen sollten, mußte ich feststellen, daß die marinen Spirochäten unter den gleichen Kulturbedingungen wie Süßwasserspirochäten sehr viel schwieriger und spärlicher wachsen als wie jene.

Die Kulturen wurden in Röhrchen angelegt, und zwar:

a) in keimfrei filtriertem Meerwasser + inaktiviertem Kaninchenserum,

b) in sterilem Leitungswasser + inaktiviertem Kaninchenserum,

c) in Ringerlösung + inaktiviertem Kaninchenserum.

Der Serumzusatz wurde von 10—50 Proz. Serum variiert; auch mit reinem Serum wurden Versuche durchgeführt. Ferner wurden Kulturen parallel mit und ohne Paraffinölüberschichtung angelegt. In reinem Serum war das Wachstum am spärlichsten; bei 10 Proz. Serumzusatz am reichlichsten. Die marinen Spirochäten durchsetzen die Kulturröhrchen nicht diffus und ziemlich gleichmäßig, sondern sind vornehmlich nur an der Oberfläche nachzuweisen. Eine Kahmhautbildung der Begleitbakterien wie bei den Süßwasser-Spirochätenkulturen wurde bei den marinen Kulturen niemals beobachtet.

Obgleich das Spirochätenwachstum an der Oberfläche am üppigsten ist, gedeihen die Kulturen doch verhältnismäßig gut mit einer geringen Paraffinölüberschichtung. Es ist dies, worauf schon Manteuffel, Noguchi, Robertson und Kligler, Ungermann u. a. hinwiesen, nicht auf den Luftabschluß zurückzuführen, sondern auf das Verhindern der Verdunstung und die Gleichmäßigkeit der dadurch bewirkten Wasserstoffionenkonzentration (ca. 0,7), welche das Gedeihen dieser Kulturen fördern.

Bezüglich des Temperaturgrades wissen wir, daß die marinen Spirochäten bei einer Temperatur von ca. 10° leben. Um gleichmäßige und niedrige Temperaturen zu erhalten, stellte ich meine Meerwasserröhrchen deshalb anfangs in den Keller. Ebenso wie die marinen Protozoen benötigen auch die marinen Spirochäten zu ihrem Gedeihen, besonders zum ersten Anwachsen in Kulturmedien, eine niedrige Temperatur. Bei dieser niedrigen Temperatur aber ist naturgemäß die Vermehrungsintensität der Spirochäten außerordentlich gering. Brachte ich jedoch die Kulturen, um die Vermehrung zu beschleunigen, in höhere Wärme-

grade (25—30°), so starben sie ab. Ich begnügte mich daher anfangs mit spärlichem Wachstum im keimfrei filtrierten Meerwasser + 10 Proz. Serumzusatz. Dabei war aber eine Weiterimpfung der Kulturen nur alle 2—3 Monate möglich.

Jetzt halte ich die Kulturen ca. 1 Jahr und erziele nun die besten Resultate, wenn ich als Medium nicht mehr keimfrei filtriertes Meerwasser, sondern Ringerlösung + 10 Proz. inaktiviertes Kaninchenserum, etwas überschichtet mit Paraffinöl, verwendet. Diese Röhrchen stehen bei ca. 22°—25° im Zimmer auf dem Brutschrank 37°. Die Vermehrung ist jetzt eine intensivere als anfangs. Die Kulturen können aber auch jetzt frühestens nach 2 Wochen überimpft werden. Das Optimum für die Ueberimpfung ist vorläufig noch 1 Monat. Die Spirochäten haben sich jetzt offenbar an die Kulturbedingungen, besonders die Temperatur gewöhnt und beginnen nun sich intensiver zu vermehren.

Bisher sind in meinen marinen Kulturen 2 Spirochätentypen angewachsen. Die eine stimmt morphologisch mit Spirochaeta icterogenes aus dem süßen Wasser überein und wurde als Spirochaeta icterogenes marina bezeichnet. Die zweite, in meinen Kulturen wachsende Spirochäte stimmt morphologisch mit Spirochaeta graminea aus dem süßen Wasser überein und ist als Spirochaeta graminea marina Zuelzer (n. subsp.) zu bezeichnen.

Die Züchtungsversuche an den marinen Spirochäten zeigen wieder, wie wesentlich für das Gedeihen von Mikroorganismen in Kulturen gelegentlich scheinbar ganz unwesentliche Punkte sein können.

Deshalb möchte ich hier auch anschließend noch einige Erfahrungen mitteilen, die ich bei der Züchtung von Recurrens-Spirochäten gemacht habe. — Es wird häufig darüber geklagt, daß Spirochaeta Obermeieri oder Duttoni in dem von Ungermann angegebenen Nährboden (inaktiviertes Kaninchenserum, mit Paraffinöl überschichtet und bei 37° gehalten) nicht gedeihe. In letzter Zeit berichten Aristowsky und Hoeltzer wiederum, daß der Ungermann-Nährboden bei der Züchtung von Spirochaeta Obermeieri versage, und geben an Stelle dessen ein anderes komplizierter zusammengesetztes Nährmedium zur Züchtung dieser Spirochaeta an. Deshalb möchte ich mitteilen, worauf es meiner Ansicht nach beruht, wenn bei der Züchtung von Spirochaeta Obermeieri auf dem Ungermannschen Nährboden an manchen Stellen Mißerfolge beobachtet wurden.

Ungermann gibt an, daß er bei Züchtungsversuchen mit Recurrensspirochäten im ganzen die gleiche Technik innehalte, wie bei der Züchtung der Hühner- und der Weilschen Spirochäte. Er züchtete Recurrensspirochäten in Uhlenhuthröhrchen in reinem, inaktiviertem Kaninchenserum bei 30° oder 37°. Ungermann empfiehlt, die Kulturen mit einer möglichst hohen Paraffinölschicht zu überschichten. Dabei ist darauf hinzuweisen, daß die Kulturen aber überschichtet werden müssen, solange sie noch (vom Inaktivieren) warm sind, da dann die Luft aus dem Serum verdrängt ist. Als wesentlich für das Gedeihen der Recurrensspirochäten im Serum bezeichnet Ungermann ferner ausdrücklich einen gewissen Zusatz von Blutkörperchen (von Mensch, Kaninchen oder Maus). Es genüge, eine Blutkörperchenmenge zu verwenden, durch die das Kultursubstrat bei gleichmäßiger Durchmischung eine nur geringfügige Trübung erfährt. Diesem Blutzusatz kommt offenbar eine besondere und das Wachstum der Recurrensspirochäten anregende Wirkung zu. Wir hatten bei der Züchtung von Kulturen von

Recurrensspirochäten stets gute Resultate, wenn wir dem Serum Kaninchenblutkörperchen zusetzten, und konnten so regelmäßig auch in Passagen weiter züchten. Ließen wir den Blutzusatz fort, so war das Wachstum dagegen sehr spärlich, und die Passagen gingen meist nicht an. Ohne Blutkörperzusatz fehlt dem Nährboden offenbar die Reizwirkung des natürlichen Wachstums, und diese wird hier wenigstens teilweise durch den Zusatz von Blutkörperchen ersetzt.

In einem neuen Nährboden, den Noguchi (25) für Leishmania und für gewisse Spirochäten, besonders Gelbfieberspirochäten angibt, setzt dieser Autor dem Serumagar Hämoglobinextrakt zu und erzielt ein gutes Spirochätenwachstum. Offenbar ist es auch hier dieselbe Reizwirkung wie in dem Ungermannschen Nährboden der Blutkörperchenzusatz, der das Wachstum befördernd wirkt.

Es scheint mir nun wahrscheinlich, daß die Wichtigkeit dieses Blutzusatzes vielleicht gelegentlich übersehen wurde, und daraus ein Versagen der Ungermannschen Methode bei der Züchtung von Recurrensspirochäten sich ergeben haben kann.

Weiterhin möchte ich noch auf einen Punkt aufmerksam machen, der für das Gedeihen der Recurrensspirochtenkulturen von Wichtigkeit zu sein scheint, und dessen Nichtbeachtung ebenfalls als Versagen der Kulturmethode gedeutet werden könnte.

Früher wurde (Zuelzer 25) bereits darauf hingewiesen, daß für die erste Anlage einer Spirochätenkultur der Virulenz der zu verwendenden Spirochäten eine wichtige Bedeutung zukommt. Für diese erste Anlage der Kultur von Recurrensspirochäten aus der Maus ist es daher wichtig, die Spirochäten von der Maus auf Kultur zu verimpfen, wenn sich die Maus in einem Stadium der Infektion befindet, wo die meisten Spirochätenteilungen wahrzunehmen sind. Verimpft man Blut der Maus in diesem Krankheitsstadium, so geht die Kultur mühelos an. Bei dem mir zur Verfügung stehenden Stamme von afrikanischer Recurrens befand sich die Maus am 3. Krankheitstage in dem geeignetsten Stadium der Infektion. Legte man die Kulturen früher an, so hatten die Spirochäten offenbar noch nicht die nötige Vermehrungsintensität, verimpfte man später, so war vermutlich schon eine Antikörperwirkung eingetreten und daraus das Versagen der Kulturen zu erklären.

Wenn man zu früh impft, muß man jedenfalls damit rechnen, daß die Kulturen, wenn überhaupt, dann außerordentlich langsam angehen. Deshalb müssen, namentlich auch bei diagnostischen Züchtungsversuchen aus dem Blute des Menschen, die angesetzten Kulturröhrchen über einen längeren Zeitraum sorgfältig beobachtet werden, da auch hier unter Umständen nur mit sehr langsamem und allmählichem Eintreten der Vermehrung der Spirochäten zu rechnen ist.

Literatur.

Aristowsky u. Hoeltzer, Ein neuer Nährboden zur Kultivierung der Spirochaete Obermeieri. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 94. S. 448.) — Noguchi u. Lindenberg, Solution and maintenance of Leishmania. (Journ. of trop. Medic. Vol. 5. 1925. No. 1.) — Ungermann, Züchtung der Weilschen Spirochaete, der Recurrens- und Hühnerspirochaete. (Arb. a. d. Kaiserl. Ges.-Amt. Bd. 51. 1918. H. 1.) — Zuelzer, Biologische und systematische Spirochätenuntersuchungen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 85. Beiheft.) — Dies., Die Spirochäten. (Prowazek, Handb. d. path. Protozoen. Lief. 11. 1925.)

Studies on Microsporidia parasitic in Mosquitoes.

IV. Observations upon the Microsporidia found in the mosquitoes of Georgia, U. S. A.[1]).

By **R. Kudo**, D. Sc.
Zoological Laboratory, University of Illinois, Urbana, Illinois, U. S. A.

With 2 Plates.

In former papers I have shown that microsporidian infection among the mosquito larvae of the genera Anopheles and Culex was found in various parts of the United States and that in many cases the infection seemed to be fatal to larvae. The observations upon which the present paper is based were made in August and September, 1923, in Georgia, U.S.A., in conjunction with the malaria control work conducted by Dr. S. T. Darling, with the support of the International Health Board of The Rockefeller Foundation.

Three species of anopheline mosquitoes — A. quadrimaculatus, A. crucians and A. punctipennis — were studied. The collection of the larvae was made in the vicinity of the stations with a dipper as usual. The larvae collected were brought into the laboratory and kept in glass containers. Many which died during transportation were examined microscopically soon after they reached the laboratory. The living larvae were inspected daily and dead ones were examined whenever found. The larvae that showed suspicious symptoms were separated from the others and kept under closer inspection. The pupae collected with the larvae or metamorphosed from the larvae after collection were kept in separate tubes, allowed to develop into adults and were identified. These adults were also examined microscopically for the parasites.

When a larva was found infected by Thelohania Legeri, a few permanent preparations were made, and the rest of the material was put aside for infection experiments. But when a few isolated spores were seen, the entire larva was examined both in smears and in sections in order to determine definitely the nature of the infection. In the case of a new species of Microsporidia, a part of the host body was made into smear preparations and the rest was fixed and studied in sections. The fixation and staining of the preparations and methods used for the study of the polar filaments were same to those which I had used before.

Microsporidia in anopheline larvae.

One of the objects of the present survey was to determine the extent of natural microsporidian infections in the anopheline larvae

1) From The International Health Board of the Rockefeller Foundation and from the Zoological Laboratory of the University of Illinois (Contribution no 266).

of the locality. Therefore, I availed myself of every opportunity of collecting as many larvae as possible from the stations. From August 20 to September 14, 1923, I collected 1450 anopheline larvae of which 594 were found dead and 856 alive at the time of microscopical examinations; of these fifty six were infected by Microsporidia. Thelahania legeri was found in fifty four larvae, while each of the three new species: T. obesa, T. pyriformis and Nosema anophelis was noticed once, the last named species occurring with Thelohania legeri.

The degree of infection per cent (about 4.5 per cent) is lower than 5.8 and 5.6 per cent observed in Illinois (3) and in New York (4) respectively. This is noteworthy in view of the fact that in Illinois and in New York where the survey was made previously, the breeding places of the mosquito larvae were confined to a definite and limited area and the number of larvae found in a square foot of water was much greater than that found in Georgia where greater bodies of water — swamps and ponds of extended area — existed at that time.

The examination of the larvae revealed the fact that the incidence of microsporidian infection among anopheline larvae is related to the number of larvae confined to a small area and also to the nature of the water in which the larvae live. Data of interest were obtained from Logan's pond where five collections were made between September 4 and 14. The portion of the pond from which the larvae were collected was greater in area than thirty square feet, the vegetation growing rather thickly. The number of larvae found there was quite large.

Further in another pond, Smith pond no. 1, where A. quadrimaculatus bred except on August 29 from which day's collection A. crucians metamorphosed in the breeding tubes, the microsporidian infection was noted to run from 2 per cent on August 23 to 6.6 per cent on September 14. The collection was made from a broader area than in Logan's pond, but the infection became more intensive as the number of larvae in that area increased.

That in part at least the infection varies with the nature of the water in which the larvae live, was noticed in Hall's pond although collection was made only once. The road side of the pond had large patches of algae growing thickly close to the surface of the water, which allowed the anopheline larvae to feed free from danger of being attacked by fishes. These larvae, however, suffered from a heavier infection of Microsporidia than those in other ponds, five out of fifty four larvae being infected. In this case, it is quite reasonable to assume that the network of algae prevented the microsporidian spores which were discharged from the infected host larvae either by their death or by rupture of the integument of the body, from sinking to the bottom of the pond so that the spores gained easy entrance to the larvae present nearby.

Speaking in general, the infection seemed to be widely spread. Where no infected larvae were found, the number of larvae collected was less than 30. However, in Lamar pond, out of twenty four larvae collected from a wide area, two were found parasitized and on another occasion one out of fourteen larvae was infected by a microsporidian. The same was true with James' pond in which the breeding area was of a considerable extent; one larva out of twenty four was found infected on September 4.

Microsporidia in adult anopheline mosquitoes.

I have elsewhere referred to Grassi's observations upon two forms of what he thought were Microsporidia in adult mosquitoes, one of which invaded eggs especially and Ross' description of a microsporidian found in adult Culex fatigans and Stegomyia sp. (4). In the course of his study of adult female mosquitoes, Christophers (1) noticed that "frequently in Anopheles a large portion or the whole of the adult ovum consists of a mass of Sporozoa" which "consist of numerous small cysts, each containing eight round or crescent-shaped bodies, each with a central chromatin spot". Nicholson (7) apparently saw a similar organism and wrote that "the yolk of a mosquito egg is frequently entirely displaced by a mass of Sporozoa. These appear as transparent spherical cysts 0,005 mm in diameter, approximating in size to the coarse yolk granules, in which eight small bodies which take up stain are found".

Hesse (2) expressed his opinion as to the occurrence of Thelohania legeri in the adult of Anopheles maculipennis as follows: "Je n'ai pas recherché cette Microsporidia chez les Anopheles adultes, mais il ne me paraît pas douteux qu'elle y parvienne, car les larves infestées ne semblaient nullement souffrir de sa présence."

Up to the time of the present investigation, I had not seen a single infected pupa or adult mosquito of any species, although I believed (3) that "there would most probably be some larvae (in the case of Culex pipiens) infected (by Stempellia magna) to a slight degree or at later days of the larval stage, which may be able to transform into pupae and even into adult mosquitoes".

Among the larvae collected from May Hole on August 24, there was noted a larva of Culex leprincei[1]) showing a typical symptom of a microsporidian infection. It was found pupated on the morning of the 26th, but remained motionless until noon when it was fixed for further study. Another culicine larva from Paul's pond no. 5, collected on August 31, showed an apparent microsporidian infection in the sixth to eighth segments of the abdomen. On September 8, it pupated and lived for two days. On the morning of September 10, it was found dead without completing the metamorphosis, although part of the thorax came through the break in the pupal skin. These two cases demonstrated definitely that when the microsporidian infection is not severe, Culex larvae metamorphose into pupae and possibly into adult stage.

In all 263 adult anophelines were examined. Most of them were bred in the laboratory and a few were caught outside of the stations. Only 31 A. crucians were examined and these were found to be free from microsporidian infection. Of 140 female A. quadrimaculatus, two were infected and of 95 males of the same species, three were infected by Microsporidia. Thus it is definitely determined that microsporidian infections occur in adult anopheline mosquitoes.

---

1) For the identification of some of the culicine larvae, I am indebted to Dr. F. M. Root of the John Hopkins University.

Of the five, four were infected by Thelohania legeri and one was parasitized by Nosema anophelis.

In the infected male from Smith pond, which was bred out in the laboratory, the adipose tissue cells were greatly distended due to the presence of an enormous number of sporonts and spores of Thelohania legeri. In the infected male from Hall's pond, most of the adipose tissue cells were filled with mature spores or spores in groups were scattered throughout the entire body cavity. The pericardial cells were mostly free from the infection. In the place where reproductive organ is normally located, huge masses of the parasite were found. As in the case of Smith pond material I cannot state whether this organ was so heavily infected by the microsporidian as to lose its histological differentiation entirely or degenerated completely due to the heavy infection of the adjacent adipose tissue.

In the infected female of Logan's pond, the ovary was not directly parasitized, but the ova were greatly underdeveloped. In the engorged "wild" female from Smith pond, which harbored Nosema anophelis in a very slight degree, no parasite was observed in the well developed ova.

In view of the circumstances as observed in the three larval hosts of Nosema anophelis which invaded the epithelial cells of the digestive tract and adipose tissue cells and in the host no. 1 of Thelohania rotunda which attacked the host's adipose tissue and judging from the observations made by previous investigators, Microsporidia of mosquitoes seem to invade tissues other than those stated here as is the case with several species of Microsporidia[1]). Further observations concerning the organisms in the adult mosquitoes are greatly desirable.

Kinds of Microsporidia observed.

A. In anopheline mosquitoes.

1. Thelohania legeri Hesse.

This microsporidian which was first found by Hesse (2) in the larvae of A. maculipennis in France, was also observed by me in A. punctipennis (3), A. quadrimaculatus (4) and A. crucians (6). The present study reveals the fact that its distribution is quite wide. Of the fifty four larvae infected by this microsporidian, thirty suffered heavy infections and showed typical symptoms — inactivity, opacity, irregular body forms and early death. It seemed quite reasonable to assume that in these host individuals the death was due to the heavy infection by Thelohania legeri comparable to those which I mentioned in my former papers. Thirteen larvae showed moderate infection, while ten harbored a small number of the organism. The stages of schizogony and of early sporogony found in the latter indicated the fact that the infection was of recent origin. Some of these lightly affected ones if left under suitable conditions would have completed metamorphosis and become adults, viewed from the finding.

1) For zoological as well as organal distribution of Microsporidia among their hosts, the reader is referred to one of my papers (Kudo: A biologic and taxonomic study of the Microsporidia. (Illinois Biolog. Monographs. Vol. 9. 1924.)

in the adult A. quadrimaculatus which were victims of microsporidian infections.

Thelohania legeri attacks primarily only the adipose tissue cells of the host body. Even when these cells are greatly distended and their nuclei highly hypertrophied due to the enormous growth of the parasite in them, other tissues seem to remain free from its invasion. Isolated spores are to be found in the general body cavity in a varying number according to the extent of infection in larvae and particulary in the adult stage. Points of biological interest related to this microsporidian were published previously in a separate paper (6).

2. Thelohania obesa nov. spec.[1]).

A larva of probably A. quadrimaculatus collected from Logan's pond on September 6, were found dead when brought into the laboratory. It was fully grown and darkly colored. The examination showed that it was heavily infected by a microsporidian for which the name Thelohania obesa is proposed. The seat of infection was the adipose tissue.

The mature spores are broadly oval with somewhat flattened ends. The spore membrane is moderately thick and refractive. Some spores showed a rounded clear area near one extremity, while others were uniformly filled with finely granulated contents. Octosporoblastic sporonts at various stages of development as well as free spores were noticed abundantly in the smears and sections. Upon fixation with either Schaudinn's or Bouin's fluid, the flattened ends become more pronounced (Figs. 2—5). The structure of the spores seems to vary, as is ordinarily the case with a microsporidian, according to the state of decolorization. In the well stained spores, one sees a sporoplasm containing a nucleus near one end of the spore (Figs. 2—5). The nucleus is characterized by an indistinct membrane and a chromatinic granule (Figs. 4, 5). The coiled polar filament is located between the sporoplasm and the other end of the spore (Figs. 2—5). When well stained, the filament is distinctly visible in a coiled and unextruded state inside the spore (Figs. 4, 5). The preserved spores measure 4—4,5 μ by 3—3,5 μ. The extruded polar filaments are 45—55 μ in length.

The schizont was not noticed. The uninucleated sporont (Fig. 6) is probably formed in a way similar to that of Thelohania legeri (6). It measures 6—7 μ in average diameter and possesses numerous deeply staining grains in its peripheral part. The sporont nucleus undergoes three divisions, typical feature of the genus, finally producing eight sporoblast nuclei (Figs. 7—9), around each of which the cytoplasm becomes condensed. Each sporoblast develops into a spore (Figs. 10, 11). The fully formed octosporous sporont, slightly flattened in a thick smeart, measure 9—10 μ (Fig. 11). Compared with Thelo-

1) This paper was completed in manuscript form in January, 1924, and was the fourth paper of the series as titled. But its appearance in printed form was delayed. These new species here described have been referred to in a recent paper; R. Kudo: A biologic and taxonomic study of the Microsporidia. (Ill. Biol. Monogr. Vol. 9, which appeared in December 1924.)

hania legeri, the deeply staining bodies which appear in the sporont during its development, are much larger in size and more conspicuous. They however disappear gradually as the spores are formed, probably being used for formation of the spore membrane (Figs. 10, 11).

Although this species seems to be rare in its occurrence and was noticed only in a single larva, its spores are unique in appearance and dimensions and its changes in sporogony are quite different from the known species of the genus. Former records and a few drawings of spores from two larvae of A. quadrimaculatus from New York which I examined in 1920 show that there I had an apparently identical organism under my observation.

While I cannot state that the microsporidian was directly responsible for the death of the host larva, I doubt if the latter could pupate under natural conditions, judging from the heavy infection to which it was subjected.

3. Thelohania pyriformis nov. spec.

Among the anopheline larvae collected from James' pond on September 4, there was noted one fairly grown larva which presented an opaque yellowish appearance and was very inactive. Microscopical examination revealed that the opacity was due to a heavy infection by a microsporidian which has hitherto not been recorded and for which the name, Thelohania pyriformis, is given. The other larvae, twenty three in number, were examined carefully, but no Microsporidia were found in them, although one harbored a nematode in its body cavity.

The host body was completely filled with nature spores which moved about inside the body cavity with the slow muscular contractions. The fat bodies were found to be the seats of infection according to observations made in fresh as well as stained smears. Whether or not other tissues were infected cannot be determined since the sections were badly mutilated.

The spore is typically pyriform (Figs. 12—14) and is circular in cross-section. It is moderately refractive and possesses a clear space, round or oval in form, at its broadly rounded posterior extremity. This clear space is a part of the sporoplasm uncovered by the coiled filament. The remaining part of the spore is filled uniformly with a finely granulated protoplasm which is the coiled filament. The fresh spores measure 4.8—5.4 μ long and 2.7—3 μ broad.

When fixed and stained, it becomes clear that the spore contains a rounded uninucleate sporoplasm near the broad end (Figs. 18—22). The nucleus is vesicular in structure and is composed of a chromatin granule and nuclear sap, surrounded by a membrane. Between the sporoplasm and the anterior extremity, the turns of the coiled filament are to be seen in many spores, those near the sporoplasm being more distinctly stained than in the other part (Figs. 20, 21).

When the spores are subjected to mechanical pressure, the polar filament is extruded from the narrow extremity of the spore (Figs. 16, 17). The spore shown in Fig. 15 received apparently a pressure not strong enough to extrude its filament, yet exhibiting the structure clearly. The fixed and stained spores are 3.5—4.2 μ long by 2—2.8 μ broad. The filament is 80—120 μ in length.

Since the infection was in an advanced state, schizogonic stages were not seen, and even early stages of sporogony were present in small number only. In Figs. 23 and 24, a tetranucleate and an octonucleate sporont are shown respectively. These sporonts were found in a thinly made smear, and were doubtlessly spread out a great deal. One sees the reticulated cytoplasm in them. The sporont membrane is indistinct and the eight sporoblasts become separated from one another during the course of further changes (Fig. 25). The chromatinic grains which were noted in other species of the genus were lacking in the present form. In this respect the species is somewhat related to T. mutabilis or T. baetica (5). Viewed from the state of the infection under which the host larva suffered, it is quite possible to attribute the cause of its death to the microsporidian.

4. Nosema anophelis nov. spec.

Host no. 1. A grown anopheline larva collected on August 29 from Smith pond no. 1 and examined on September 2, contained in addition to some scattered spores of T. legeri, another microsporidian represented by a number of mature spores (Figs. 48—51).

Host no. 2. A larva of A. quadrimaculatus collected from the same locality on September 11 and studied in sections, showed a similar form in the epithelial cells of the gastric pouch (Fig. 26). Other part of the digestive tract and the adipose tissue were free from the infection. A number of epithelial cells of the gastric pouch of the host were infected by various stages of the parasite. Here the situation was somewhat comparable to that of the larvae of Bombyx mori suffering from a light intestinal infection of Nosema bombycis.

The youngest stage found is a spherical body measuring about 1.5 μ in diameter and contains a comparatively large vesicular nucleus (Fig. 27). It was found in small numbers and in scattered condition in the epithelial cells in which later stages were not present. It grows at the expense of the host cell body (Figs. 28—30) and undergoes a binary fission (Figs. 31—40). The division, although seen rarely, seems to be repeated. Unlike Nosema bombycis the schizonts do not fill the host cells before spores are formed. An infected host cell shown in Fig. 26 is not filled with the parasite, yet the lower half of it contains mature and developing spores. In this case there seem to be some factors other than the lack of space and nutrient in the host cell which initiates the process of sporogony. A sporont transforms itself into a spore Figs. 41—44), which characterises the genus Nosema. The stained spores show somewhat varying appearances (Figs. 26, 45—47). A number of infected host cells that were cast off and isolated spores were seen in the lumen of the gastric pouch.

Host no. 3. An apparently similar form was found in an engorged adult of Anopheles quadrimaculatus caught on September 11 in a hollow tree which stood close to the pond where the above mentioned larvae were collected. In this host, it was found that the epithelial cells of the anterior portion of the mid-gut contained similar spores (Fig. 55). In the adipose tissue located close to the mid-gut, however, stages of sporogony (Figs. 52, 53) were observed. A sporont shown in Fig. 52 is practically same to that found in the second host (Fig. 41).

The fresh spores found in the first host were oblong, one end being slightly narrower than the other. Frequently the sides are asymmetrical in one view, one side being slightly concave, while the other somewhat convex (Fig. 50). It is moderately refractive. In many spores a large vacuole is to be seen at one extremity. The spore membrane is very thin and weak and a slight pressure of the immersion objective upon the cover glass causes the extrusion of the filament, which was observed in several spores. The fresh spores measure 4.7—5.8 μ long by 2.3—3.2 μ thick. The extruded filament is relatively short, being 50—60 μ in length. The fixed and stained spores measure 4—5.2 μ by 2.5 μ. Those from the second host measure 4—5.5 μ by 2.2—2.5 μ. The fixed and stained spores from the third host measure 4—5 μ by 2—2,5 μ.

I maintain that these three forms are identical with one another. The name, Nosema anophelis, is proposed for the form from the second host. In the third host ova which were well developed, were apparently free from the parasite.

B. In culicine mosquitoes.

5. Thelohania rotunda nov. spec.

A young larva of Culex leprincei obtained from Smith pond no. 1 on August 8, was found infected by a new microsporidian for which Thelohania rotunda is proposed. The posterior part of the larva showed some masses of the parasite that were visible with unaided eye, although the infection was moderate.

The spore is broadly ovoid or subspherical. The membrane is relatively thick which gives a highly refractive appearance to the spore. It contains an oval clear space at one end. Upon staining, the rest of the spore becomes deeply stained (Figs. 59, 60). The spores on smears fixed with Schaudinn's mixture and stained with Heidenhain's iron haematoxylin measure 2.5—3 μ by 2.3—2.7 μ.

The spherical octosporous sporont measures 6,5 μ in diameter. As far as I was able to ascertain, the adipose tissue was the only seat of infection. It is quite possible that the infection was of recent origin, since the larva was active and the large part of the tissue was uninfected.

6. Thelohania opacita Kudo.

An unidentified culicine larva from Logan's pond collected on September 8 was heavily infected by the present species. This species was originally described from three larvae of Culex testaceus (C. apicalis) of New York (3)[1]). The larva under consideration was fully grown and presented a typical opaque white appearance. Although still living it was extremely inactive at the time of examination.

The spore is broadly ellipsoid and circular in cross-section. In some spores, one end is more rounded than the other (Figs. 62, 63, 65, 66), while in others the ends are equally truncated (Fig. 64). A rounded

1) The development of T. opacita, addition of Culex territans as its host and its wide distribution are mentioned in another paper just appeared: R. Kudo, Studies on Microsporidia parasitic in mosquitoes. VI. On the development of Thelohania opacita, a culicine parasite. (Journ. Parasit. Vol. 11. 1924.)

triangular, oval or circular clear space is always present in mature spores, while the other part of the spores is uniformly and finely granulated. When stained the spore presents appearances such as shown in Figs. 67—70. When the spores are subjected to mechanical pressure the filament becomes extruded from the side (Fig. 71) and not from the end as is ordinarily the case. Further in a moderately pressed spore, a longitudinal line is to be seen on the spore membrane (Fig. 72). I am inclined to think that in this species the spore membrane is composed of two valves which meet with each other on a sutural line here noted.

The sporoblast as was stated before is normally octosporous (Fig. 65), but frequently tetrasporous (Fig. 66). Consequently they give rise to spores of two different dimensions of essentially same structures. The fresh normal spores measure 5.5—6 μ long by 3.5—4 μ broad (Figs. 62—64). The spores fixed with Schaudinn's mixture and stained with Heidenhain's iron haematoxylin are 4.5—5.5 μ by 3.3—4 μ. The extruded polar filaments are 90 to 110 μ long. The large spores measure 8—8.5 μ by 4.5—5.5 μ in fresh conditions and 6.5—7.5 μ by 5—5.2 μ in fixed and stained state. The infection was restricted to the adipose tissue, but it was distributed throughout the host body to such an extent that the host larva was extremely sluggish and showed only feeble muscular contraction when examined on September 9.

7. Thelohania minuta nov. spec.

Host no. 1. In a larva of Culex leprincei collected from May Hole on August 24, typical symptoms of microsporidian infection were noticed. It continued to live until the morning of August 25 when it was found pupated and lying motionless on the bottom of the rearing jar. An examination showed that it was parasitized by a microsporidian possessing very minute spores.

Host no. 2. In a larva of the same species collected from Smith pond no. 1 on August 28, a moderate infection by a microsporidian was noted. In fresh state, the spores were identical in dimensions and structure with those found in the first host.

Host no. 3. The adipose tissue of a grown larva of the same species of mosquito collected on September 2 from the same locality was lightly infected by the same species.

Host no. 4. A grown larva of the same species from the same locality showed that its fat bodies in the sixth to eighth abdominal segments were infected by a microsporidian. It lived until 6 p. m. September 7 when it was found dead. Examinations revealed a rather heavy infection by the same microsporidian.

Host no. 5. A young larva of the same species collected from Lamar's pond on September 5 was found, upon examination on the following day, that the fat bodies on both sides of the abdomen were infected by the microsporidian.

Host no. 6. A grown unidentified Culex larva obtained from Cannon's pond no. 1 on September 1, was found dead on September 8. Upon examination it was found that the larva had been dead for some time and the body was to a great extent disintegrated. The body cavity was completely filled with the spores which were identical in dimensions and structure with those from the first host.

Host no. 7. An unidentified Culex larva collected from Paul's pond no. 5 on August 31, was noted at the time of collection to show a typical opacity in the abdomen. It continued to live in the rearing jar and pupated on September 6. After two days of pupal life it started to cast off its skin, but failed and died. It proved to be infected by the same microsporidian.

So far as I have studied, there do not seem to be any differences which might lead one to differentiate more than one species of Microsporidia among those that were observed in the seven host insects mentioned above, I therefore propose to name the species Thelohania minuta and base its description on the form found in the host no. 1.

The fresh spores are ovoid in form, equally rounded at both ends; it is circular in cross-section. The contents of the spore are uniformly and finely granulated and almost completetely fill the intrasporal cavity (Figs. 74—76). In many spores, a faintly visible narrow strand connects the contents with one of the extremities. This is probably the basal portion of the coiled filament. The spores measure 3.5—3.9 μ long by 2.4—2.7 μ broad. When fixed in Zenker's fluid and stained with Giemsa's solution, the spores appear somewhat truncated at the ends (Figs. 81, 82), while those that were fixed with Schaudinn's mixture and stained with Heidenhain's iron haematoxylin measure 2.5—3.3 μ by 1.5—2 μ. The spores from the host no. 2 which were fixed in formalin showed a somewhat different aspect (Figs. 79, 80, 86).

The primary seat of infection is the adipose tissue. But in the first host which was a dead pupa, the infection extended into the ventral nerve chord (Fig. 73). The muscles also seemed to become infected. The reproductive organ was not seen in the portion of the body that was sectioned.

Infection experiments.

Due to the lack of material at the beginnning of the study and the brief stay at the place, only four infection experiments under laboratory conditions were attempted, the material of one of which was accidentally destroyed on the third day of experiment. The results obtained through these experiments were not as conclusive as those which I obtained by a similar experiment with Stempellia magna[1]) which is a very much larger microsporidian than the present form and which was found parasitic in Culex pipiens and C. territans both of which are more easily reared than anopheline larvae in the laboratory, yet they show that some of the larvae kept in the emulsions of infected host bodies for Thelohania legeri become infected.

The infection apparently takes place through the mouth in the present case as in many species of Microsporidia. The spore seems to germinate in the posterior half of the mid-gut. The sporoplasm leaves the spore membrane and then penetrates through the lining epithelial cells as in the case of Stempellia magna, since the first indication of the infection is to be noticed in the adipose tissue cells surrounding

1) The data related to Stempellia magna have recently been published in another paper: R. Kudo, Studies on Microsporidia parasitic in mosquitoes. V. Further observations upon Stempellia (Thelohania) magna parasitic in Culex pipiens and C. territans. (Biol. Bull. Vol. 48. 1925.)

that part of the mid-gut. It seems to be probable that the number of larvae which become infected through experimental infection depends upon the amount of mature spores present in the emulsion. In the experiments, I have tried to make as uniform emulsions as possible under the circumstances; but after diluting them with water, I always found that some of the infected adipose tissue cells were hard to break and they remained together in groups. If spores in such masses are taken into the alimentary canal of a larva, an infection would be established in the host body quickly; on the other hand, when a larva engulfs isolated spores floating in the water, it would take some time for it to become infected to any observable degree.

The probable modes of infection in nature.

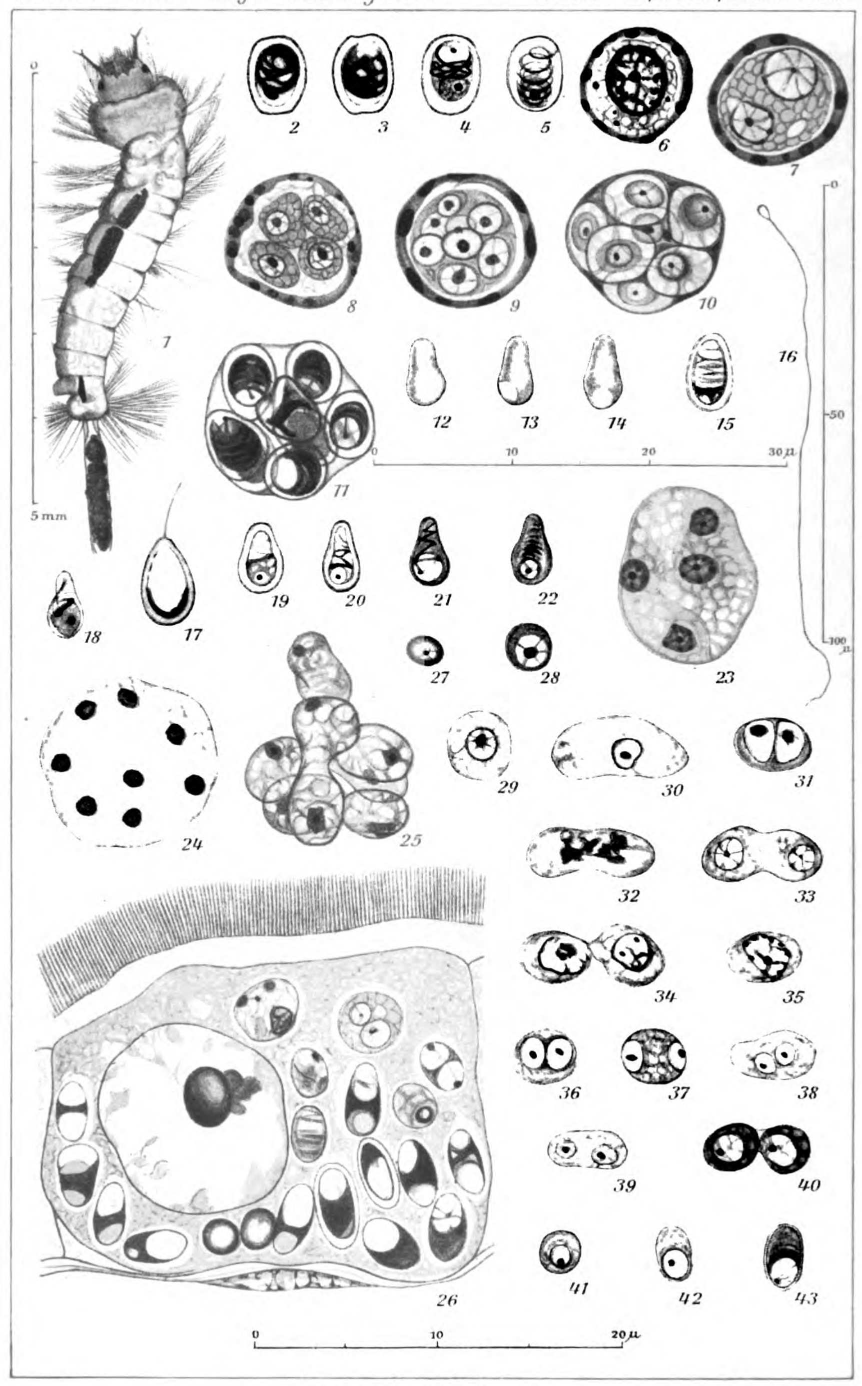
As was shown by the infection experiments, the anopheline larvae become infected by Thelohania legeri when kept in an emulsion of the latter. Data obtained through similar experiments with other forms of Microsporidia clearly indicate that the infection takes place through the mouth. This undoubtedly occurs most frequently in nature and the Microsporidia become disseminated among the larvae. When a number of larvae breed together within a small area and the conditions of the water are favorable, the infection seems to spread among the host larvae very quickly as was noticed in Logan's pond, Smih's pond no. 1 and Hall's pond.

The fact that adult anophelines are also infected would explain the wide distribution of the Microsporidia among different bodies of water. Whether or not the eggs of the host insect are invaded by a microsporidian as Christophers, Grassi and Nicholson noticed in cases of their Sporozoa, is not known to me at present in the species of Microsporidia I have studied, since as was stated above, in the infected adults I examined, the reproductive organs except those of the engorged one which contained well developed ova, were either not seen or underdeveloped.

I have elsewhere (6) remarked about the fact that the mosquitoes of the genera Anopheles and Culex have microsporidian parasites characteristic to the genus. The present study confirms the statement. The Culex larvae were more abundant than the Anopheles larvae in every locality examined, and the former were collected only when they were found in the dipper with the latter. Therefore, it will readily be seen that the culicine larvae studied were living side by side with the anopheline larvae. Yet they were infected only by Microsporidia typical to the genus.

Summary.

1) Of 1450 anopheline larvae of Georgia, U.S.A., 4.5 per cent were infected by Microsporidia of which four species were distinguished. — 2) Microsporidian infection among anopheline larvae increases with the increase in number of larvae living in a limited area and with certain conditions of the growth of algae in the water. — 3) One "wild" engorged A. quadrimaculatus was lightly infected by Nosema anophelis nov. spec., which was also found in two larvae. — 4) Four



Verlag von Gustav Fischer in Jena. P. Weise Lith. Jena

adult A. quadrimaculatus bred in the laboratory, were found to be infected by Thelohania legeri, which indicates that a light or moderate infection during larval life does not prevent the larva from completing its metamorphosis. — 5) Infection of ova by Microsporidia was not observed. — 6) Thelohania legeri was seen in fifty four larvae of which thirty seemed to be infected very heavily. — 7) Thelohania obesa nov. spec. and T. pyriformis nov. spec., parasitic in anopheline larvae, are described. — 8) Anopheline larvae become infected by Thelohania legeri per os. — 9) Three species of Microsporidia parasitic in the culicines, Thelohania opacita, T. rotunda nov. spec. and T. minuta nov. spec., are described.

Papers cited.

1) Christophers, S. R., The anatomy and histology of the adult female mosquito. (Rep. Malaria Comm. Roy. Soc. Ser. 4. 1901.) — 2) Hesse, Ed., Thelohania Legeri n. sp., Microsporidie nouvelle, parasite des larves d'Anopheles maculipennis Meig. (Compt. Rend. Soc. Biol. T. 57. 1904.) — 3) Kudo, R., Studies on Microsporidia with special reference to those parasitic in mosquitoes. (Journ. Morph. Vol 35. 1921.) — 4) Ders., Studies on Microsporidia parasitic in mosquitoes. II. On the effect of the parasites upon the host body. (Journ. Parasit. Vol. 8. 1922.) — 5) Ders., Microsporidian parasites of ephemerid nymphs. (Ibid. Vol. 10. 1923.) — 6) Ders., Studies on Microsporidia parasitic in mosquitoes. III. On Telohania Legeri Hesse (= T. illinoisensis Kudo). (Arch. f. Protistkd. Bd. 49. 1924.) — 7) Nicholson, A. J., The development of the ovary and ovarian egg of a mosquito, Anopheles maculipennis Meig. (Quart. Journ. Micr. Sci. N. S. Vol. 65. 1921.)

Explanation of Plate I.

The scale placed on the bottom of the plate applies to all the figures except Figs. 1, 12—15 and 16.

Fig. 1. Dorsal view of a dead anopheline larva showing the abdomen heavily infected by Thelohania legeri. The posterior portion of the digestive tract is seen extruding through the anus. This larva was active on the morning of September 7, but was found dead at 1.30 p. m.
Figs. 2—5. Spores of Thelohania obesa.
Figs. 6—11. Stages in sporogony of Thelohania obesa.
Figs. 12—14. Fresh spores of Thelohania pyriformis.
Fig. 15. A moderately compressed spore of the same species.
Figs. 12—15 should be compared with the scale placed under them.
Fig. 16. Spore with extruded filament. The scale is on the right.
Fig. 17. The same spore highly magnified.
Figs. 18—22. Mature spores in stained condition.
Figs. 23—25. Three stages in sporogony of the same species.
Figs. 26—43. Nosema anophelis. All from sections.
Fig. 26. An infected host cell.
Fig. 27. A young schizont.
Figs. 28—30. Later stages of the schizont.
Figs. 31—34. Division stages of the larger schizonts.
Figs. 35—40. Division stages of the smaller schizonts.
Figs. 41—43. Spore formation.

Explanation of Plate II.

The scale placed below Figs. 83—85 should be applied to all the figures except Figs. 48—51 (with scale directly below), Figs. 62—64 (scale directly under), Figs. 73—76 (their scales are placed directly under.)

Figs. 44—58. Nosema anophelis.
Figs. 44—46. Stained mature spores.
Fig. 47. A portion of the host cell containing three spores.

Figs. 48, 49. Fresh spores.
Figs. 50, 51. Different views of a single fresh spore.
Figs. 52, 53. A sporont and a young spore found in the periintestinal adipose tissue cells of an engorged adult.
Fig. 54. An end view of a spore.
Figs. 55—58. Mature spores.
Figs. 59—61. Two spores and an octosporous sporont of Thelohania rotunda.
Figs. 62—72. Thelohania opacita.
Figs. 62—64. Three fresh spores.
Figs. 65, 66. Octosporous and tetrasporous sporonts in fresh state.
Figs. 67—69. Spores.
Fig. 70. A stained octosporous sporont greatly flattened.
Fig. 71. A spore mechanically compressed during the preparation of the smear, extruding its filament from the side.
Fig. 72. A spore found in the same smear showing the sutural line.
Figs. 73—86. Thelohania minuta.
Fig. 73. The infected ganglion of host no. 1.
Figs. 74—76. Fresh spores from host no. 1.
Figs. 77, 78. Spores from host no. 6.
Figs. 79, 80. Spores from host no. 2.
Figs. 81, 82. Spores from host no. 1.
Figs. 83, 84. Spores from host no. 1.
Fig. 85. An octosporous sporont from host no. 1.
Fig. 86. The same from host no. 2.

Ueber Trypanosomen.

IV. Mitteilung: Der Nachweis des Mangels der das Trypanosomenphänomen der Wiederbelebung bedingenden Substanzen in Serum und Leber chronisch infiziert gewesener, trypanosomenkranker Tiere.

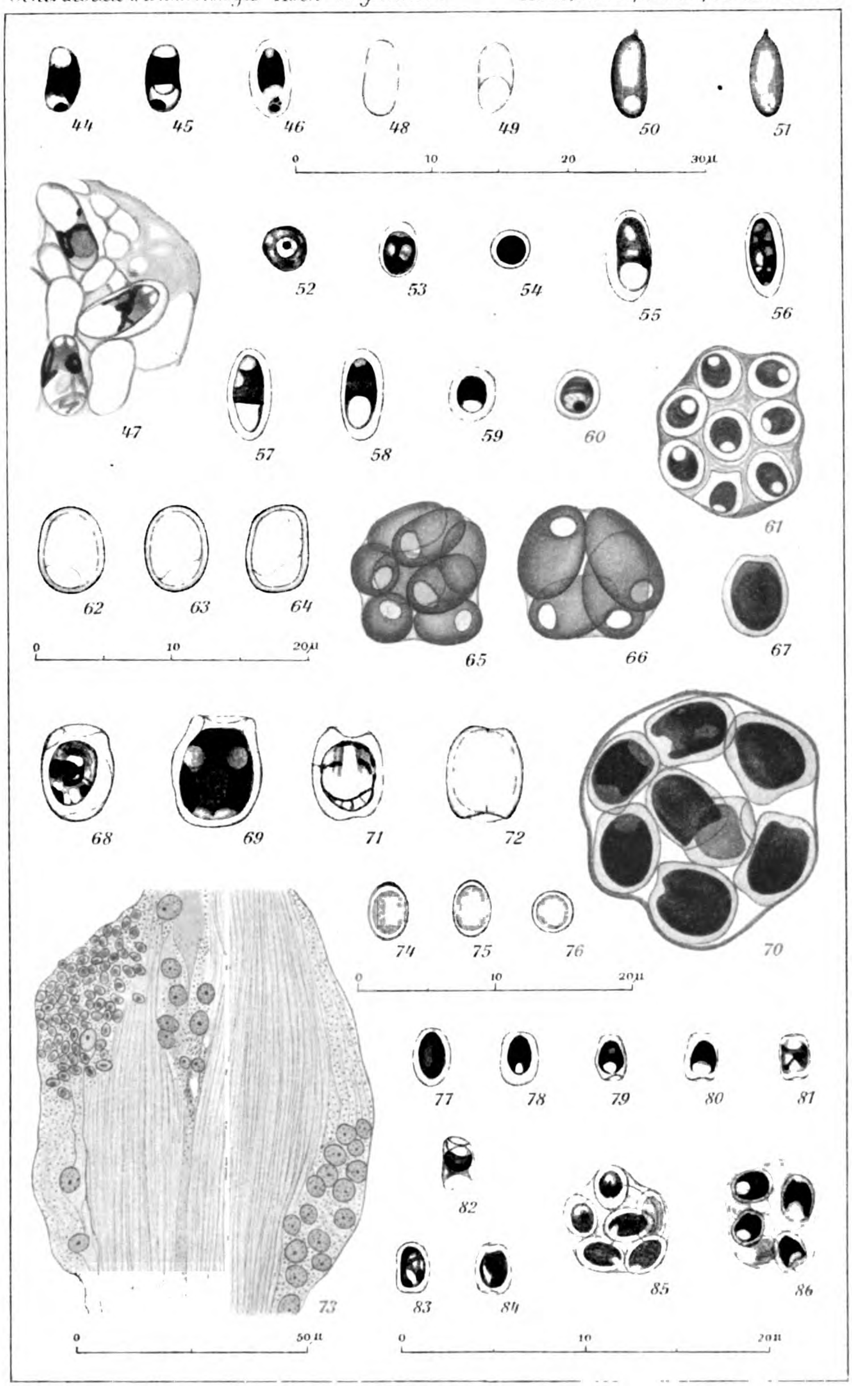
[Aus dem Bakteriologischen Institut der Tierärztlichen Hochschule zu Montevideo (Direktor: Prof. Dr. Kurt Schern).]

Von Prof. Dr. **Kurt Schern.**

Beim Studium der für Trypanosomen wiederbelebend, bzw. lebensverlängernd wirkenden Substanzen des Serums sind bisher von mir fast ausschließlich weiße Ratten verwendet worden, welche nach einer Infektion mit pathogenen Trypanosomen meist akut erkranken und dementsprechend nach kurzer Krankheitsdauer verenden.

Vom praktischen Standpunkt aus war es nicht ganz ohne Bedeutung, festzustellen, ob sich im chronisch infizierten Organismus mit Bezug auf die erwähnten Serumkörper dieselben Vorgänge beobachten lassen, wie im akut erkrankten. Gerade die Trypanosomiasen, wie z. B. die Schlafkrankheit des Menschen, die Dourine usw., repräsentieren sich in der Praxis oft als chronische Erkrankungen, deren Diagnose nicht immer leicht ist, und für deren Erkennung jedes Hilfsmittel, selbst wenn es keinen absoluten Wert besitzt, willkommen sein wird.

Es war in dieser Beziehung auch wichtig, das frische Serum, welches aus Leichen von an Trypanosomeninfektion eingegangenen Tieren herrührte, zu untersuchen.



… von Gustav Fischer in Jena

Zunächst wurde das Serum eines Kaninchens untersucht, welches am 29. 8. 24 mit Mal de Caderas infiziert und am 14. 9. 24 klinisch erkrankt war.

Es hatte am linken oberen Augenbogen ein starkes Oedem.

Am 15. 9. 24 hatte dieses zugenommen, und die Lidspalte war nur noch etwas geöffnet. Am 19. 9. 24 hatte sich auch ein Oedem am Nasenrücken ausgebildet, so daß der Kopf des Tieres ein unförmiges Aussehen hatte.

Am 22. 9. 24 wurden erstmalig im Blutpräparat des Tieres vereinzelt Trypanosomen nachgewiesen, am 25. 9. 24 ist die Lidspalte infolge des Oedems am linken Auge angeschwollen.

Am 26. 9. 24 wird dem Tier etwas Blut zum Zwecke der Serumgewinnung entnommen und dieses Serum im nachfolgenden Versuch auf seine wiederbelebenden Stoffe für bereits unbeweglich gewordene Trypanosomen geprüft.

	Angesetzt 10⁰⁰ Uhr früh	10⁴⁵ Uhr	12²⁵ Uhr	3³⁰ Uhr	5³⁰ Uhr	6⁸⁾ Uhr	9⁰⁰ Uhr abds.	Am anderen Tage früh 9³⁰ Uhr
1/4 ccm Serum vom chronisch kranken Kaninchen + 1/4 ccm Trypanosomenaufschwemmung, in welcher die Trypanosomen soeben unbeweglich geworden sind	unbeweglich	Trypanosomen auf d. Stelle beweglich, agglutiniert	wie vorhin	wie vorhin	unbeweglich	—	—	—
1/4 ccm Normalkaninchenserum + 1/4 ccm Trypanosomenaufschwemmung, in welcher die Trypanosomen soeben unbeweglich geworden sind (Kontrolle)	dgl.	sehr lebhaft beweglich	dgl.	dgl.	sehr lebhaft beweglich	wie vorhin	wie vorhin	einzelne Trypanosomen schwach a.d.Stelle bewegl., andere unbewegl.

Aus diesem Versuch geht hervor, daß die Trypanosomen im Serum des chronisch trypanosomenkranken Kaninchens noch nach nicht ganz 7std. Versuchsdauer unbeweglich sind. Dagegen leben die Trypanosomen der gleichen Provenienz im normalen Kaninchenserum weit über diese Zeit hinaus, einzelne von ihnen sind sogar noch 14 Std. darüber hinaus beweglich. Das beweist, daß die wiederbelebenden Stoffe, nach früheren Versuchen vermutlich der Blut- bzw. Leberzucker, im Serum des chronisch kranken Kaninchens gegenüber denen im normalen Serum sehr erheblich abgenommen haben.

Das Kaninchen hat am 29. 9. 24 auf der Oberfläche der Haut des Oedems flache Substanzverluste, welche wenig eitriges Sekret absondern. Zu Beginn des Versuches wog das Tier 1520 g und am 1. 10. 24, als der Tod an Mal de Caderas erfolgte, nur 1465 g.

Am 1. 10. 24 wurde bei der Obduktion das Herzblutkoagulum entnommen und durch Zentrifugieren aus ihm etwas Serum gewonnen.

Außerdem wurde ein Stückchen Leber in der üblichen Weise mit etwas NaCl zu Leberbrei verrieben. Dieses Serum und der Leberbrei wurden im folgenden Versuch bezüglich ihrer Wirkung auf Trypanosomen untersucht.

Die Prüfung des Serums in der Leber des Tieres nach dem Tode zeigt die folgende Tabelle (S. 442).

Aus diesem Versuch ist ersichtlich, daß die Trypanosomen in dem Serum und der Leber des an chronischer Trypanosomiasis verendeten Kaninchen nicht annähernd so lange beweglich sind, wie im normalen Kaninchenserum. Mithin sind besteht bezüglich des Serums und der

	Angesetzt 7 Uhr abds.	7^{15} Uhr abends	8^{10} Uhr abends	9^{25} Uhr abends	10^{20} Uhr abends	11 Uhr abends	11^{25} Uhr abends
1) ½ ccm Serum + ½ ccm Trypanosomenaufschwemmung	Trypanosomen leben	etwas Agglomeration, lebhaft	fast alle Trypanosomen unbeweglich, sie schlagen mit der Geißel auf der Stelle	in großen Klumpen agglomeriert, unbeweglich	—	—	—
2) ½ ccm Leberbrei + ½ ccm Trypanosomenaufschwemmung	dgl.	dgl.	Trypanosomen langsam auf der Stelle beweglich	schwach, auf der Stelle beweglich	unbeweglich	—	—
3) ½ ccm Normalkaninchenserum + ½ ccm Trypanosomenaufschwemmung (Kontrolle)	„	sehr lebhaft beweglich	sehr lebhaft beweglich	sehr lebhaft beweglich	sehr lebhaft beweglich	sehr lebhaft beweglich	sehr lebhaft beweglich
4) ½ ccm 0.85proz. NaCl - Lösung + ½ ccm Trypanosomenaufschwemmung (Kontrolle)	„	fast alle Tryp unbewegl., die übrigen schwach beweglich	unbeweglich	—	—	—	—
5) (Kontrolle) ½ ccm Trypanosomenaufschwemmung	„	dgl.	dgl.	—	—	—	—

Leber des chronisch trypanosomenkrank gewesenen Kaninchens gegenüber dem Normalkaninchensrum ein großer Unterschied, in diesem Serum und in dieser Leber mangelt es an lebensverlängernden, bzw. wiederbelebenden Stoffen. Da diese nach meinen früheren Versuchen vornehmlich aus Blut- bzw. Leberzucker bestehen, so ist der Mangel an Blut- und Leberzucker ein Charakteristikum der chronischen Trypanosomiasis.

Das Ergebnis, welches die vorstehenden Versuche mit Kaninchenserum und Leberbrei gezeitigt haben, ist ferner auch in Experimenten mit dem Serum und der Leber eines an Mal de Caderas verendeten Pferdes beobachtet worden. Das fragliche Pferd ist am 29. 8. 24 mit Mal de Caderas-Trypanosomen subkutan infiziert worden und erkrankte in der Folgezeit unter typischen Fieberreaktionen. Am 25. 9. 24 wurde dem Tier etwas Blut zum Zwecke der Serumgewinnung und dessen Untersuchung hinsichtlich seiner Wirkung auf Trypanosomen entnommen, ebenso einem normalen Pferde. Beide Sera wurden zunächst im Eisschrank bis zu ihrer am 2. 10. 1924 erfolgenden Untersuchung aufbewahrt. An diesem Tage verendete das Tier plötzlich. Bei der Obduktion wurden erhebliche Blutmengen in der Bauchhöhle infolge einer Leberruptur festgestellt. Die Leber war hochgradig parenchymatös degeneriert. Von der Leber wurde etwas in NaCl-Lösung verrieben und dieser Leberbrei zur nachfolgenden Untersuchung verwendet ebenso wie das zu Lebzeiten entnommenene, mit labilen Trypanosomen entnommene Mal de Caderas - Serum, als auch das normale Kontrollpferdeserum. Die nachfolgende Tabelle veranschaulicht den Versuch.

	Angesetzt 7^{05} Uhr abends	7^{15} Uhr abends	8^{10} Uhr abends	9^{05} Uhr abends	10^{25} Uhr abends	11 Uhr abds.	11^{35} Uhr abds.
1) 1/2 ccm Normalpferdeserum (Kontrolle) v. 25. 9. 24 + 1/2 ccm Trypanosomenaufschwemmung von Ratte	sehr lebhaft beweglich	sehr lebhaft beweglich	sehr lebhaft beweglich	sehr lebhaft beweglich	sehr lebhaft beweglich	lebhaft beweglich	beweglich
2) 1/2 ccm Mal de Caderas-Pferdeserum v. 25. 9. 24 + 1/2 ccm Trypanosomenaufschwemmung von Ratte	dgl.	große Agglomeration, lebhaft	große Agglomeration; am Rande d. agglomerativen Haufen sind Trypanosomen beweglich	am Rande der agglomerativen Hauf. schwach beweglich	unbeweglich	—	—
3) 1/2 ccm Mal de Caderas - Pferdeleberbrei v. 2. 10. 24 + 1/2 ccm Trypanosomenaufschwemmung von Ratte	„	etwas Agglomeration, lebhaft	etwas agglomeriert, Trypanosomen sind auf der Stelle beweglich	manche Trypanosomen sind unbeweglich, d. anderen wenig bewegl.; etwas Agglomeration	unbeweglich	—	—
4) 1/2 ccm 0,85proz. NaCl-Lösung (Kontrolle) + 1/2 ccm Trypanosomenaufschwemmung von Ratte	„	fast alle Trypanosomen unbewegl., die anderen schwach beweglich	unbeweglich	—	—	—	—
5) (Kontrolle) 1/2 ccm Trypanosomenaufschwemmung allein	„	dgl.	unbeweglich	—	—	—	—

Zu bemerken ist, daß in dem vorstehenden Versuche eine Kontrolle mit normaler Pferdeleber nicht angesetzt werden konnte, weil sie momentan nicht erhältlich war. Aber das übt auf die Beurteilung des Gesamtresultates insofern keinen Einfluß aus, als aus meinen früheren Versuchen hinlänglich bekannt ist, daß gerade die normale Pferdeleber die das Trypanosomenphänomen auslösenden Stoffe in sehr großer Menge enthält. Außerdem ist in dem Versuche eine Kontrolle mit normalem Pferdeserum vorhanden, und in früheren Versuchen habe ich die engen Beziehungen, welche zwischen den fraglichen Stoffen der Leber und des Serums bestehen, festgestellt. Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß das normale Pferdeserum nicht nur das Mal de Caderas-Pferdeserum, sondern sogar die Mal de Caderas-Pferdeleber hinsichtlich seiner lebensverlängernden Wirkung auf Trypanosomen weit übertrifft. Daraus geht hervor, daß in dem Serum und der Leber dieses an Mal de Caderas verendeten Pferdes die das Phänomen auslösenden Substanzen sehr erheblich verringert sind.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß in der Leber und im Serum der an chronischer Trypanosomiasis leidenden Tiere ein erheblicher Mangel an Substanzen besteht, welche das Trypanosomenphänomen auslösen.

Ueber Trypanosomen.

V. Mitteilung: Das Trypanosomenphänomen und die Wirkung von Dextrose- und Lävuloselösungen sowie von Leberbrei-Insulin auf labile Trypanosomen.

[Aus dem Bakteriologischen Institut der Tierärztlichen Hochschule zu Montevideo (Direktor: Prof. Dr. Schern).]

Von Prof. Dr. **Kurt Schern.**

Schon in früheren Arbeiten (Arb. a. d. Kais. Gesundh.-Amt, Bd. 38) habe ich mitgeteilt, daß ein großer Teil der im Handel beziehbaren Stoffe der Leber von mir hinsichtlich der lebensverlängernden Wirkung etc. auf Trypanosomen untersucht worden ist. Die damals von mir angestellten Versuche sind insofern negativ verlaufen, als keiner der von mir im Experiment verwendeten Stoffe gegenüber den Trypanosomen eine ähnliche Wirkung entfaltete, wie Serum und Leberextrakt von normalen Tieren.

Die von mir in den vorhergehenden Mitteilungen wiedergegebenen Feststellungen über das Vorhandensein vergärbarer Substanzen bzw. von Zucker in den Leberextrakten, welche das Trypanosomenphänomen auslösen, und über das Fehlen des Zuckers in den Lebern der an einer Trypanosomiasis verendeten Tiere, ferner die Eigentümlichkeit normaler, aber vergorener Leberextrakte, das Trypanosomenphänomen nicht mehr auszulösen etc. etc., veranlaßten mich, erneut Zuckerarten hinsichtlich ihrer Wirkung auf Trypanosomen zu prüfen. Jedoch habe ich in diesen Versuchen im Gegensatz zu den früheren Versuchen (l. c.) verwendeten Zuckerlösungen verschieden starke Zuckerkonzentrationen auf die labilen Trypanosomen wirken lassen. Die nachfolgende Tab. (S. 445) veranschaulicht einen solchen Versuch.

I.

Wirkung von Dextroselösungen (1-, 2- u. 3proz. in 0,85proz. NaCl-Lösung) auf labile Trypanosomen im Vergleich mit Normalkaninchenserum.

Aus diesem Versuch geht hervor, daß die Dextroselösungen einen lebensverlängernden Einfluß auf die Trypanosomen ausüben. Allerdings wirkte die 2proz. Lösung in dieser Beziehung nicht so deutlich wie die 1proz. Lösung. Vergleicht man aber diese Wirkung mit der des Normalkaninchenserums, so fällt der Vergleich zugunsten des Kaninchenserums aus, denn in diesem sind die Trypanosomen noch „lebhaft beweglich", während sie in der 1proz. Dextroselösung unbeweglich sind.

Der Ausfall dieses Versuches gab die Veranlassung, Zuckerlösungen, deren Konzentration unter 1 Proz. lag, hinsichtlich ihrer Wirkung auf Trypanosomen zu prüfen. Denn da diese 1proz. Lösung gegenüber der 2proz. und 3proz. einen wirkungsvolleren Einfluß auf die Trypanosomen ausgeübt hatte, so war anzunehmen, daß geringere, unter

	Angesetzt 7 Uhr abds.	7^{15} Uhr	8^{10} Uhr	9^{25} Uhr	10^{20} Uhr	11 Uhr	11^{25} Uhr
1) $^1/_2$ ccm Dextroselösung 1proz. + $^1/_2$ ccm Trypanosomenaufschwemmung in Natr. citric.	lebt	lebhaft beweglich	die meisten Trypanosomen auf der Stelle beweglich	einige Trypanosomen gut beweglich, andere sehr schwach beweglich	einige Trypanosomen unbeweglich, andere schwach beweglich	fast alle Trypanosomen unbewegl., einige schwach zuckend auf der Stelle	unbeweglich
2) $^1/_2$ ccm Dextroselösung 2proz. + $^1/_2$ ccm Trypanosomenaufschwemmung in Natr. citric.	„	dgl.	beweglich	auf der Stelle zuckend und mit der Geißel schlagend	viele Trypanosomen unbeweglich, andere auf der Stelle beweglich	unbeweglich	—
3) $^1/_2$ ccm Dextroselösung 3proz. + $^1/_2$ ccm Trypanosomenaufschwemmung in Natr. citric.	„	dgl.	viele Trypanosomen unbeweglich, die anderen wenig beweglich	viele Trypanosomen unbeweglich, die anderen auf der Stelle zuckend	fast alle Trypanosomen unbeweglich, ab und zu eine Gruppe auf d. Stelle mit der Geißel schlagend	dgl.	—
4) $^1/_2$ ccm 0,85proz. NaCl-Lösung + $^1/_2$ ccm Trypanosomenaufschwemmung in Natr. citric.	„	fast alle Trypanosomen unbeweglich, die übrig. schwach beweglich	unbeweglich	—	—	—	—
5) $^1/_2$ ccm Trypanosomenaufschwemmung in Natr. citric.	„	dgl.	unbeweglich	—	—	—	—
6) $^1/_2$ ccm Normalkaninchenserum + $^1/_2$ ccm Trypanosomenaufschwemmung in Natr. citric.	„	dgl.	sehr lebhaft beweglich	sehr lebhaft beweglich	sehr lebhaft beweglich	sehr lebhaft beweglich	lebhaft beweglich

	Angesetzt 4^{30} Uhr nachm.	4^{55} Uhr	6^{05} Uhr	6^{55} Uhr	7^{10} Uhr	8^{10} Uhr	9^{10} Uhr	Bemerkungen
1) $^1/_2$ ccm Dextroselösung 0,1proz. (in 0,85proz. NaCl-Lösung) + $^1/_2$ ccm Trypanosomenaufschwemmung v. Ratte	leben	lebend	schwach beweglich	unbeweglich	—	—	—	Um 4^{55} haben die Flüssigkeiten in den Röhrchen Nr. 1–8 eine fast schwarzrote Farbe, während sie in Nr 8 und 9 eine hellrote Farbe aufweisen. — In den Röhrchen mit Pferdeserum senken sich die Rattenblutkörperchen viel schneller als in den Zuckerlösungen. Auch sind die Rattenblutkörperchen im Pferdeblutserum stark konglomeriert nach kurzer Zeit.
2) $^1/_2$ ccm Dextroselösung 0,5proz. (in 0,85proz. NaCl-Lösung) + $^1/_2$ ccm Trypanosomenaufschwemmung v. Ratte	„	sehr lebhaft	sehr lebhaft	die meisten Trypanosomen unbewegl., die anderen schwach auf der Stelle beweglich	wie 6^{55}	unbeweglich	—	
3) $^1/_2$ ccm Dextroselösung 1proz. (in 0,85proz. NaCl-Lösung) + $^1/_2$ ccm Trypanosomenaufschwemmung v. Ratte	„	sehr lebhaft	dgl.	die meisten Trypanosomen auf der Stelle gut beweglich	sehr schwach auf der Stelle beweglich	fast alle Trypanosomen unbewegl., die ander. schwach auf der Stelle beweglich	unbeweglich, Trypanosomen sehr schwer auffindbar	
4) $^1/_2$ ccm Lävuloselösung 0,1proz. (in 0,85proz. NaCl-Lösung) + $^1/_2$ ccm Trypanosomenaufschwemmung v. Ratte	„	lebend	„	schwach auf der Stelle beweglich	viele Trypanosomen unbeweglich, die anderen sehr schwach, auf der Stelle beweglich	unbeweglich	—	
5) $^1/_2$ ccm Lävuloselösung 0,5proz. (in 0,85proz. NaCl-Lösung) + $^1/_2$ ccm Trypanosomenaufschwemmung v. Ratte	„	sehr lebhaft	„	einige Trypanosomen sehr lebhaft, die anderen auf der Stelle gut beweglich	wie 6^{55}	fast alle Trypanosomen unbeweglich, die anderen schwach auf der Stelle beweglich	einige Trypanosom. schwach, auf der Stelle beweglich Trypanosom. sehr schwer auffindbar	
6) $^1/_2$ ccm Lävuloselösung 1proz. (in 0,85proz. NaCl-Lösung) + $^1/_2$ ccm Trypanosomenaufschwemmung v. Ratte	„	sehr lebhaft	„	dgl.	wie 6^{55}	einige Trypanosomen gut beweglich, die anderen schwach auf der Stelle beweglich	dgl.	
7) $^1/_2$ ccm Normalpferdeserum 1proz. + $^1/_2$ ccm Trypanosomenaufschwemmung v. Ratte	„	sehr lebhaft	„	manche Trypanos. unbeweglich, die anderen schwach, auf d. Stelle bewegl.	unbeweglich	—	—	
8) $^1/_2$ ccm 0,85proz. NaCl-Lösung + $^1/_2$ ccm Trypanosomenaufschwemmung v. Ratte	„	unbeweglich	—	—	—	—	—	
9) $^1/_2$ ccm Trypanosomenaufschwemmung von Ratte	„	unbeweglich	—	—	—	—	—	

	Angesetzt 3^{15} nachm.	3^{30} Uhr	4^{15} Uhr	5^{30} Uhr	7^{00} Uhr	7^{45} Uhr	8^{40} Uhr	9^{30} Uhr	10^{00} Uhr
1) $^1/_2$ ccm Dextroselösung 0,1proz. (in 0,85proz. NaCl-Lösung) + $^1/_2$ ccm Trypanosomenaufschwemmung von Ratte in Natr. citric.	unbeweglich	gut beweglich	gut beweglich	sehr lebhaft beweglich	sehr lebhaft beweglich	beweglich	unbeweglich	—	—
2) $^1/_2$ ccm Dextroselösung 0,5proz. (in 0,85proz. NaCl-Lösung) + $^1/_2$ ccm Trypanosomenaufschwemmung von Ratte in Natr. citric.	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.	„	schwach beweglich	schwach beweglich	unbeweglich
3) $^1/_2$ ccm Dextroselösung 1proz. (in 0,85proz. NaCl-Lösung) + $^1/_2$ ccm Trypanosomenaufschwemmung von Ratte in Natr. citric.	„	„	„	„	„	lebhaft beweglich	beweglich	dgl.	dgl.
4) $^1/_2$ ccm Lävuloselösung 0,1proz. (in 0,85proz. NaCl-Lösung) + $^1/_2$ ccm Trypanosomenaufschwemmung von Ratte in Natr. citric.	„	„	„	„	„	dgl.	schwach beweglich	„	„
5) $^1/_2$ ccm Lävuloselösung 0,5proz. (in 0,85proz. NaCl-Lösung). + $^1/_2$ ccm Trypanosomenaufschwemmung von Ratte in Natr. citric.	„	„	„	„	„	„	dgl.	„	schwach beweglich
6) $^1/_2$ ccm Lävuloselösung 1proz. (in 0,85proz. NaCl-Lösung) + $^1/_2$ ccm Trypanosomenaufschwemmung von Ratte in Natr. citric.	„	„	„	„	„	„	lebhaft beweglich	gut beweglich	gut beweglich
7) $^1/_2$ ccm 0,85proz. NaCl-Lösung + $^1/_2$ ccm Trypanosomenaufschwemmung von Ratte in Natr. citric.	„	unbeweglich	—	—	—	—	—	—	—
8) $^1/_2$ ccm Trypanosomenaufschwemmung von Ratte in Natrium citric.	„	dgl.	—	—	—	—	—	—	—
9) $^1/_2$ ccm Normalkaninchenleberextrakt + $^1/_2$ ccm Trypanosomenaufschwemmung von Ratte in Natr. citric.	„	gut beweglich	gut beweglich	beweglich	beweglich	beweglich	schwach beweglich	unbeweglich	—
10) $^1/_2$ ccm Normalhühnerleberextrakt + $^1/_2$ ccm Trypanosomenaufschwemmung von Ratte in Natr. citric.	„	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.	unbeweglich	—	—	—

1 Proz. liegende Zuckermengen noch deutlicher auf die Trypanosomen wirken. Es wurde der nachfolgende Versuch angestellt.

II.

Wirkung von Dextrose- und Lävuloselösungen (0,1-, 0,5- u. 1proz.) auf labile Trypanosomen im Vergleich mit Normalpferdeserum.

Auch aus diesem Versuch folgt, daß die Dextroselösungen und die Lävuloselösungen einen lebensverlängernden Einfluß auf labile Trypanosomen ausüben. Das Optimum der Konzentration der Lösung liegt zwischen 0,5 und 1 Proz, während 0,1 Proz. nur in unbedeutender Weise auf die Motilität der Trypanosomen wirkt. Bemerkenswert ist auch, daß nach diesem Versuche die Lävulose die Beweglichkeit der Trypanosomen stärker beeinflußt als die Dextrose, denn die 0,5proz. Lävulose wirkt ebenso wie eine 1proz. Dextroselösung. Diese Lösungen wirken auch stärker auf die Beweglichkeit der Trypanosomen ein, als das zum Vergleich herangezogene Normalpferdeserum.

Es kam jetzt noch darauf an, die Wirkung der Zuckerarten mit der von Leberextrakten zu vergleichen. Zu diesem Zwecke wurde der vorstehende Versuch (Tab. S. 447) angestellt.

		Um 7 Uhr abds.	Gleich nach 7 Uhr abends	7^{20} Uhr abds.	8^{10} Uhr
1) $^1/_4$ ccm Meerschweinchenleberbrei + $^1/_4$ ccm Insulin (Brand)	Diese 6 Röhrchen 1 Std. bei 37° und danach 6 Std. bei Zimmertemperatur gehalten; dann Trypanosomen zugesetzt	$^1/_2$ ccm labile Mal de Caderas-Trypanosomenaufschwemmung zugesetzt	Sehr lebhaft beweglich, da das Material sehr dicht ist, so ist die freie Beweglichkeit d. Trypanosom. gehemmt	In großen Klumpen agglomeriert sehr lebhaft, nicht frei beweglich	wie 7^{20} Uhr
2) $^1/_4$ ccm Meerschweinchenleberbrei + $^1/_2$ ccm 0,85-proz. NaCl-Lösung		dgl.	sehr lebhaft	sehr lebhaft, frei beweglich	dgl.
3) $^1/_4$ ccm Meerschweinchenleberbrei		dgl.	dgl.	Sehr lebhaft. Da das Material sehr dicht ist, sind Trypanosomen nicht frei beweglich	„
4) $^1/_4$ ccm Insulin		dgl.	„	Schwach auf der Stelle sich langsam windend u. mit d. Geißel schlagend	unbeweglich
5) $^1/_2$ ccm 0,85-proz. NaCl-Lösung		dgl.	„	Die meisten Trypanosomen unbeweglich, d. anderen schwach auf der Stelle beweglich	dgl.
6) —		dgl.	„	langsam beweglich	Die meisten Trypanosomen unbewegl., die anderen schwach auf der Stelle beweglich

III.

Wirkung von Dextrose- und Lävuloselösungen auf labile Trypanosomen im Vergleich mit Normalleberextrakt von Kaninchen und Huhn.

In diesem Versuche sind die Verdünnungen der Leberextrakte vom normalen Kaninchen und Huhn folgendermaßen hergestellt worden: 5 g Extraktsubstanz werden in 100 ccm physiologischer NaCl-Lösung aufgelöst, davon wird je $^1/_2$ ccm mit $4^1/_2$ ccm 0,85proz. Kochsalzlösung gemischt, die Mischung wird aufgekocht, abgekühlt und dann im Versuch verwendet. Die Zuckerlösungen sind ebenfalls mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt worden. — Die Trypanosomen waren zu Beginn des Versuches unbeweglich und befanden sich somit im sehr labilen Stadium.

Der Ausfall dieses Versuches zeigt, daß die verwendeten Dextrose- und Lävuloselösungen stärker lebensverlängernd wirken, als die Extrakte der normalen Lebern. Besonders fällt in dieser Beziehung auch in diesem Experiment die Wirkung der 1proz. Lävuloselösung auf, in welcher die Trypanosomen noch nach fast 7std. Versuchsdauer gut beweglich sind. Die Dextroselösungen stehen hinsichtlich ihrer lebensverlängernden Wirkung für Trypanosomen den Lävuloselösungen (0,5proz. und 1proz.) bedeutend nach.

8^{20} Uhr	8^{50} Uhr	8^{55} Uhr	9^{25} Uhr	10^{10} Uhr	10^{15} Uhr	11^{10} Uhr
wie 7^{20} Uhr	Auf der Stelle beweglich, in großen Klumpen agglomeriert	Nochmals $^1/_4$ ccm Insulin zugegeben	Die meisten Trypanosomen unbeweglich, die anderen schwach auf der Stelle beweglich	unbeweglich	—	—
dgl.	sehr lebhaft, frei beweglich	—	sehr lebhaft beweglich	sehr lebhaft beweglich	sehr lebhaft beweglich	gut beweglich
„	wie 7^{20} Uhr	—	wie 7^{20} Uhr	wie 7^{20} Uhr	wie 7^{20} Uhr	wie 7^{20} Uhr
—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—
unbeweglich	—	—	—	—	—	—

In Uebereinstimmung mit den von mir angestellten Gärversuchen hat sich auch aus diesen Versuchen ergeben, daß tatsächlich der Zucker ein sehr bedeutender Faktor beim Zustandekommen des von mir beobachteten Trypanosomenphänomens ist. Denn die vergorenen Leberextrakte, welche also zuckerfrei sind, lösen das Phänomen nicht aus, anderenteils bewirkt Zucker, besonders Lävulose das Phänomen noch besser als Normalserum oder Normalleberextrakt. Ich möchte deshalb vorschlagen, das von mir beobachtete Phänomen zukünftig als das „Zuckerphänomen der Trypanosomen" zu bezeichnen, wobei je nach der Lage des Falles auch die Bezeichnungen „Serumzucker- oder Leberzuckerphänomen" zu verwenden wären.

Die erforderliche, einschlägige Literatur habe ich hier leider nicht zur Verfügung. Ich kann deshalb Einzelheiten aus dieser nicht betrachten. Jedoch ersehe ich aus dem „Handbuch der mikrobiologischen Technik" von Kraus und Uhlenhuth, 1. Bd., daß Nöller (auf S. 666) dem Traubenzucker eine besondere Rolle für die Kultur der Trypanosomen und Leptomonaden beimißt. Bei seiner Darstellung erwähnt der Autor die Arbeiten von Biot, C., und Biot, R., und Richard, ferner von Fleig, von Johns, von Hagemeister und von Schern. Soweit ich aus den Nöllerschen Angaben ersehen kann, haben alle diese Autoren — jeder vom Standpunkt des Zieles seiner Arbeiten — die von mir zuerst seinerzeit (Arbeiten aus dem Kais. Gesundheitsamt, Bd. 38) erhobenen Befunde bestätigen können, welche ich jetzt zusammenfassend unter dem Begriffe des „Zuckerphänomens" vereinige. Vielleicht empfiehlt es sich in Zukunft, auch die Bedeutung der Lävulose für das Leben der Trypanosomen besonders hervorzuheben.

Soweit ich aber auch ferner aus den Angaben ersehe, hat bisher kein einziger der Autoren das Zuckerphänomen in eine Beziehung zur Pathogenese der Trypanosomiasen gebracht. Das ist von mir gleich in meiner ersten Arbeit, dann aber auch in der zweiten über dieses Phänomen geschehen, und ich werde in einer anderen Mitteilung diese Fragen noch eingehender behandeln.

Vorerst schien es mir nicht unwichtig zu sein, in Erfahrung zu bringen, wie das für den Zuckerhaushalt des Organismus so bedeutungsvolle Insulin zusammen mit normaler Leber auf Trypanosomen wirkt.

Zu diesem Zweck wird ein Meerschweinchen (200 g schwer) entblutet und dessen Leber sofort im Mörser zerrieben (ohne Zusatz einer Flüssigkeit). Von dem Leberbrei wird ungefähr $^1/_4$ g auf den Boden eines Reagenzröhrchens gebracht, dazu wird $^1/_4$ ccm Insulin (Brand) gegeben und das Röhrchen 1 Std. im Brutschrank bei 37° und danach noch 6 Std. bei Zimmertemperatur gehalten, damit das Insulin auf den Leberzucker eventuell einwirken kann. Nach einiger Zeit wird nochmal $^1/_4$ ccm Insulin zu dem Leberbrei gegeben. In gleicher Weise werden die entsprechenden Kontrollen behandelt, wie es aus der vorstehenden Tabelle S. 448 u. 449 näher ersichtlich ist.

Aus diesem Versuch ist ersichtlich, daß die Trypanosomen in der Mischung von Insulin und Leberbrei nach einer Versuchsdauer von 3 Std. und 10 Min. unbeweglich sind, während sie in der Kontrolle von Leberbrei und physiol. Kochsalzlösung noch 1 Std. länger gut beweglich sind. Die anderen Kontrollen beweisen die Richtigkeit des Versuches. Nach dem Resultat dieses Versuches scheint es, als ob das Insulin das Leberzuckerphänomen der Trypanosomen etwas hemmt.

Weitere Versuche müssen hierüber Aufschluß bringen. — Auffallend ist, daß der Insulin-Leberbrei die Trypanosomen schon nach einer Versuchsdauer von 20 Min. „in großen Klumpen" agglomeriert. Ob das stets der Fall ist, werden weitere Versuche entscheiden.

Es soll hier nicht unerwähnt bleiben, daß alle die von mir in meinen bisherigen Trypanosomenarbeiten erhobenen Befunde die Veranlassung für mich gewesen sind, den Blutzucker von solchen Tieren chemisch bestimmen zu lassen, welche mit Trypanosomen infiziert worden sind. Diese Untersuchungen sind noch im Gange, sie haben aber schon bis jetzt recht bemerkenswerte Resultate gezeitigt. So hat im Blute eines an Mal de Caderas verendeten Pferdes fast nur noch die Hälfte der normalen Menge Blutzucker im Herzblut nachgewiesen werden können. Es hat also eine erhebliche Hypoglykämie bei dem Tiere bestanden. Wir werden später ausführlich darüber berichten, wie sich die Blutzuckerkurve während der Infektion gestaltet.

Ueber Trypanosomen.

VI. Mitteilung: Erörterungen über die Pathogenese der Trypanosomiasis auf Grund der Beobachtungen über das Zuckerphänomen der Trypanosomen.

[Aus dem Bakteriologischen Institut der Tierärztlichen Hochschule zu Montevideo (Direktor: Prof. Dr. Kurt Schern).]

Von Prof. Dr. **Kurt Schern.**

Aus meinen früheren und jetzigen Arbeiten über das von mir gefundene Zuckerphänomen der Trypanosomen ergeben sich vorläufig folgende Tatsachen:

1. Im Serum und in der Leber normaler Tiere sind bestimmte Stoffe, welche auf unbeweglich gewordene Trypanosomen wiederbelebend, bzw. lebensverlängernd wirken. Den Hauptanteil dieser Stoffe stellt der Zucker dar. 2. Im Serum von Tieren, welche mit Trypanosomen infiziert sind, verschwinden diese Stoffe bzw. der Zucker allmählich mit dem Fortschreiten der Infektion. 3. In Serum und Leber von Tieren, welche einer Trypanosomiasis erlegen sind, fehlen die Stoffe bzw. der der Zucker. 4. Bei Ratten, welche von einer Trypanosomiasis durch ein Arsenpräparat geheilt werden, treten die Stoffe bzw. der Zucker allmählich mit dem Fortschreiten des Heilungsprozesses bzw. dem Verschwinden der Trypanosomen aus dem Körper wieder auf. 5. Im Serum und Leberextrakt, welcher von normalen Tieren stammt, sind die Stoffe bzw. der Zucker in konzentrierter Form vorhanden. Verdünnungen solcher Extrakte lösen ebenfalls das Zuckerphänomen aus, wobei die Blutkörperchen der in solchen Versuchen verwendeten Trypanosomenaufschwemmungen eine dunkelrote Farbe aufweisen, wahrscheinlich infolge der Stoffwechseltätigkeit der Trypanosomen. 6. Die in derartigen normalen Leberextrakten vorhandenen Stoffe bzw. der Zucker sind aus den Extrakten mit Hilfe der Hefegärung entfernbar. 7. Durch Hefe vergorene Extrakte der Lebern normaler Tiere lösen das Zuckerphänomen der Trypanosomen nicht aus. 8. In den Leberextrakten, welche von Tieren

stammen, die einer Trypanosomiasis erlegen sind, fehlen die in den Leberextrakten normaler Tiere vorhandenen, durch Hefe vergärbare Stoffe bzw. der Zucker im Gegensatz zu Extrakten von normalen Lebern. 9. Ratten, welche sich im 3. bzw. im Endstadium einer Trypanosomeninfektion befinden, scheiden nach künstlicher Kohlehydratbelastung der Leber die Kohlehydrate mit dem Urin aus. 10. Lävulose- und Dextroselösungen (0,5 Proz. in 0,05proz. NaCl-Lösung) bewirken das Zuckerphänomen der Trypanosomen. Insulin hemmt das Zuckerphänomen etwas. Die chemische Untersuchung des Blutes trypanosomeninfizierter Tiere ergibt eine Hypoglykämie in den vorgeschritteneren Stadien der Infektion.

Welche allgemeinen Schlußfolgerungen lassen sich aus den vorstehend mitgeteilten Tatsachen herleiten hinsichtlich der Pathologie der Trypanosomiasis, bzw. der Erklärung der Wirkungsweise von pathogenen Trypanosomen im Organismus?

Die Hefe hat die Eigenschaft, Zucker zu vergären. Da sie in den vorstehenden Versuchen die Extrakte normaler Lebern stark vergoren hat, so folgt daraus, daß auch im Extrakte normaler Lebern Zucker vorhanden ist. Normale Leberextrakte lösen das Trypanosomenphänomen aus. Vergorene Leberextrakte bewirken das Phänomen nicht. In ihnen fehlt der Zucker. Mithin kann man annehmen, daß der Zucker eine der Hauptursachen ist, welche das von mir beschriebene Trypanosomenphänomen auslöst, welches jetzt als „Zuckerphänomen der Trypanosomen" von mir bezeichnet wird. Da aber das Phänomen nur aus Lebern, bzw. aus Leberextrakten normaler Tiere, nicht aber von Lebern etc. solcher Tiere ausgelöst wird, die der Trypanosomeninfektion erlegen sind, so ist verständlich, daß sich bei trypanosomeninfizierten Tieren mit fortschreitender Infektion allmählich eine Verarmung des Organismus an Zucker ausbildet, daß eine Hypoglykämie besteht, wie auch die chemische Untersuchung des Blutes zeigt. Der Blut- und Leberzucker wird von den Trypanosomen allmählich in irgendeiner Form für ihren Stoffwechsel aufgebraucht, es tritt anfänglich eine Blutzuckersenkung auf, diese reguliert zunächst die Leber durch entsprechende Abgabe von Zucker an das Blut. Der Vorgang wiederholt sich infolge der Vermehrung der Trypanosomen ins Ungeheuere fortwährend, bis schließlich die Leber erschöpft und fast völlig frei von Zucker ist. Darin beruht eine pathogene Wirkung der Trypanosomen, welche sich hinsichtlich der Leber auch durch deren Funktionsstörung nach Kohlehydratbelastung zu Lebzeiten des infizierten Organismus äußert. Später folgt bei der Infektion die absolute Hypoglykämie mit allen ihren Folgen und sie ist als hypoglykämischer Symptomenkomplex bekannt.

Die Erschöpfung der Zucker- bzw. der Glykogenvorräte der Leber führt dazu, daß die Leber die normalerweise in ihr stattfindende Verarbeitung der N-Schlacken im intermediären N-Stoffwechsel nicht mehr leisten kann, weil diese Funktion an die Gegenwart von Zucker gebunden ist[1]). Von diesem weiß man auch, daß es eine große Bedeu-

1) Steinbrinck, Ueber die klin. u. experimentelle Beobachtung der hypoglykämischen Reaktion bei Leberparenchymschädigungen. (Klin. Woch. 1924. S. 1029.)

tung für die Entgiftung bestimmter Stoffwechselprodukte besitzt (cf. Hummel, Klin. Wochenschrift. 1904. Nr. 35. S. 1573). Vielleicht wird auch während einer Trypanosomiasis der Blut- und Leberzucker zur Beseitigung der von den Trypanosomen wahrscheinlich produzierten Stoffwechselprodukte verbraucht. Man kann sich jedoch auch vorstellen, daß der Zucker für die Ernährung der Trypanosomen benötigt wird. Wenn tatsächlich die Trypanosomen Stoffwechselprodukte an den Organismus abgeben, so erscheint es jetzt einer Erklärung zugänglich, weshalb wir diese niemals nachweisen können. Sie werden stets durch den Zucker entgiftet und die wenigen im Augenblick des Todes des infizierten Tieres im Organismus vorhandenen Gifte reichen nicht aus, um bei anderen Warmblütern Vergiftungserscheinungen zu erzeugen, zumal bei diesen nach einer Injektion der vermeintlichen Gifte ebenfalls sofort der Leberzucker entgiftend wirkt. Sei dem, wie ihm wolle, der für das Leben der Parasiten verwendete Leberzucker fehlt dem infizierten Organismus für den übrigen Zellstoffwechsel, zuerst speziell in der Leber. Aus diesen Umständen folgt eine Anhäufung von unvollkommenen, körpereigenen Stoffwechselprodukten, welche ihrerseits zur Intoxikation führt. Das ist nach Fischler die glykoprive Intoxikation. Tatsächlich besteht aber bei der Trypanosomeninfektion auch eine Leberparenchymschädigung und eine Destruktion lebenswichtiger Leberzellbestandteile, was ich durch die Kohlehydratbelastung nachgewiesen habe [1]. Derartige Parenchymschädigungen bewirken autolytische und andere Vorgänge. Dieser gesamte Komplex von Tatsachen führt zu den den Klinikern gut bekannten, eigenartigen Krämpfen, geistigen Störungen, Delirien und schließlich zum Leberkoma, in dem gewöhnlich eine Harnsäureanhäufung wie bei der Leberexstirpation zu befürchten ist, wodurch der Tod des Patienten erfolgen kann. Nach neueren Untersuchungen wird hier der Kohlehydratstoffwechsel des Zentralnervensystems eine besondere Bedeutung erlangen, wie es die Arbeit von Takahaschi wahrscheinlich macht [2].

Unter diesen Gesichtspunkten können die allgemeinen Krankheitserscheinungen von seiten der großen, nervösen Apparate, wie sie z. B. bei der Schlafkrankheit des Menschen, bei der Dourine, bei der Mal de Caderas auftreten und bei den anderen Trypanosomiasen beobachtet werden, teilweise ihre Erklärung finden.

(Wie schon angedeutet, sind bei den Spirilleninfektionen meine Versuche noch nicht abgeschlossen, ich glaube aber auch auf diesem Gebiet zu ähnlichen Schlüssen zu kommen.)

Alles in allem betrachtet, ist die Trypanosomiasis eine „Zuckerkrankheit“, allerdings in einem anderen als in dem in der Medizin von dem Diabetes mellitus her geläufigen Sinne. Man kann sie vielleicht als eine „Zuckerhungerkrankheit“ bezeichnen.

Den Krankheitsprozeß bei der Trypanosomiasis (und wahrscheinlich auch bei der Spirillose) hat man sich im gedanklichen Ausbau der obigen Befunde in einfachster Form so zu denken:

Während einer Trypanosomeninfektion wird der eine Teil des Leberzuckers von den Trypanosomen allmählich verbraucht, wobei gleichzeitig der andere Teil von ihm bei der Erfüllung seiner übrigen physiologischen Aufgaben dem Verbrauch unterliegt. Infolge dieses Zucker-

1) Berl. tierärztl. Woch. 1913. Nr. 40.

2) Takahaschi, Hypoglykämie und Kohlenhydratstoffwechsel d. Zentralnervensystems. (Klin. Woch. 1914. Nr. 42.)

mangels ist die Arbeit der Leber, bzw. ihres Parenchyms geschädigt, das allmählich bis zur völligen Arbeitsunfähigkeit zerstört wird. Dieser Vorgang spielt sich hinsichtlich der Parasiten so ab, daß jeglicher von den Leberzellen gebildete Zucker u. a. sofort für die Trypanosomen Verwendung findet. Da sich diese in ungeheurer Menge im Organismus vermehren, so hat die Leber dauernd Zucker abzugeben und kann auf die Dauer dieser von ihr geforderten Zuckerproduktion nicht mehr genügen, bzw. der Organismus kann nicht schnell genug ausreichenden Zuckerersatz heranschaffen. Infolgedessen wird sie weiterhin auch ihren übrigen physiologischen Aufgaben nicht mehr gerecht, sie bricht zusammen und die Folge davon ist die allgemeine Intoxikation.

Alle diese Ueberlegungen führen auch dazu, die Therapie der Trypanosomiasen und ähnlicher Krankheiten (Spirilleninfektionen) noch von anderen als den bisherigen Gesichtspunkten in Angriff zu nehmen. Ob man dabei an den Organismus unter Beobachtung gewisser diätetischer Maßnahmen ein reichliches Kohlehydratangebot zu richten hat, oder ob man die lebenswichtigen Kohlehydrate etc. der Leber so im Gewebsparenchym fixiert, daß sie während einer Blutparasiteninfektion nicht angreifbar sind und infolgedessen dem Organismus für seinen Stoffwechsel erhalten bleiben etc., oder ob man den Körper von dem für die Trypanosomen lebenswichtigen Blut- und Leberzucker bis zu einer gewissen Grenze befreit, werden weitere Arbeiten zeigen, die bereits im Gange sind.

Allerdings will ich gleich bemerken, daß bisher fast alle die in diesen Richtungen von mir angestellten Versuche nicht die gewünschten Resultate gezeitigt haben.

Ein neuer Apparat zum Zählen von Kolonien.

[Aus dem Hygiene-Institut der Universität Greifswald (stellv. Direktor: Prof. Dr. Carl Prausnitz).]

Von Dr. **Karl Koch**,
Assistent am Institut.

Mit 1 Abbildung im Text.

Um das Auszählen der Kolonien, die auf einer Platte gewachsen sind, zu erleichtern, sind bisher verschiedene Methoden angegeben worden. Alle gehen von dem Prinzip aus, die Kulturenplatte in kleinere Teile einzuteilen, um so ein systematisches Auszählen zu ermöglichen. Der Nachteil, der allen diesen Methoden anhaftet, besteht darin, daß man beim Zählen selbst, um günstige Lichtverhältnisse zu haben, den Rumpf und den Kopf vorbeugen und so eine Körperhaltung einnehmen muß, die bei längerem Zählen sehr anstrengend und ermüdend ist. Will man mit der Lupe auszählen, so ist man genötigt, mit der Lupe nahe an die Kultur heranzugehen, es wird ein Schatten geworfen und das Objekt verdunkelt. Dadurch wird das eine Auge übermäßig belastet. Diese beiden Faktoren: Ermüdung der angespannten Muskulatur und des Auges können die Genauigkeit der Zählung benachteiligen.

Ich habe versucht, einen Apparat zu konstruieren, der diese Nach-

teile ausschließen soll. Beibehalten habe ich als Netzeinteilung die nach den Angaben von Wolffhügel eingeteilte Glasplatte. Neu ist die durch die Anwendung von Spiegeln ermöglichte Betrachtung des Bildes in normaler Körperhaltung mit beiden Augen.

Der Apparat[1]) besteht aus einem rechteckigen, 25 cm hohen, kastenähnlichen Gestell. Drei der vertikalen Seiten sind, um störendes Licht von vorn und von den Seiten abzufangen, durch Messingplatten abgeschlossen, die zur Vermeidung der Reflexion innen geschwärzt sind. Oben auf dem Gestell liegt die Glasscheibe mit dem Quadratnetz, auf welche die auszuzählende Kultur gestellt wird. Im Inneren eingebaut ist ein Spiegel von 12 cm Durchmesser. Dieser ist auf der

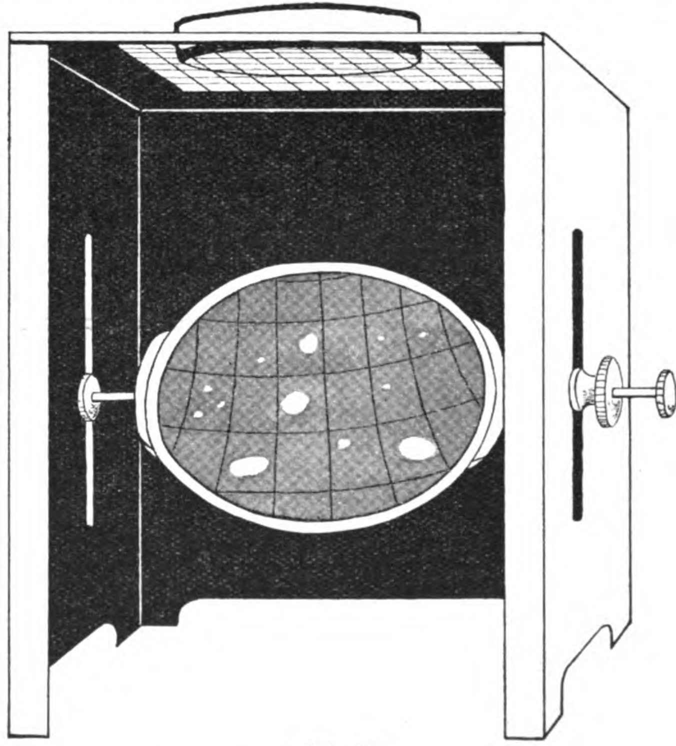


Fig. 1.

einen Seite plan und auf der anderen konkav (Brennweite 20 cm); er ist um eine Horizontalachse drehbar und nach oben und unten verschieblich. Mit diesem Spiegel fängt man das Bild der Platte und ihrer Kolonien zusammen mit der Netzteilung auf und kann nun mit Leichtigkeit in normaler Kopf- und Körperhaltung binokular die gewachsenen Kolonien auszählen.

Benutzt man den Planspiegel, so erscheint das Bild in natürlicher Größe, während der Hohlspiegel ein entsprechend vergrößertes Bild entwirft. In beiden Fällen wird das Bild binokular, also stereoskopisch gesehen. Um noch stärkere Vergrößerungen zu erreichen,

1) Der Apparat wird hergestellt durch die Wissenschaftlich-Technische Werkstätte m. b. H., Greifswald, DRGM. a.

kann man eine Lupe mit großem Durchmesser (Leseglas) zwischen Objekt und Spiegel einschalten.

Daß die Quadrate der Glasplatte und die zu zählenden Kolonien nicht in einer Ebene liegen, ist ein Umstand, der nur durch eine kostspielige und umständliche Prismenanordnung ausgeglichen werden könnte; er bietet aber beim Zählen mit diesem Apparate keine größeren Schwierigkeiten, als bei den bisher gebräuchlichen Methoden.

Die Beleuchtung des Objektes erfolgt mit natürlichem oder künstlichem Licht schräg von vorn oben, wobei die Niveauunterschiede in den Kolonien gut zum Ausdruck kommen. Sie kann aber auch bei künstlichem Licht im rechten Winkel zum späteren Strahlengang geschehen, wobei dann die Kolonien auf dunklem Grund aufleuchten. Die Auszählung von Kolonien auf undurchsichtigen Nährböden (Loeffler-Serum, Blutagar, Kochblutagar) geschieht so, daß die Platte umgekehrt, mit der Schicht nach unten, auf die Netzplatte gelegt und durch den Petrischalenrand hindurch intensiv beleuchtet wird.

Wünscht man eine exzentrisch gelegene Stelle der Kultur in die Mitte des Spiegels zu bekommen, so verschiebt man die Netzplatte, ohne daß die Lage der Kultur auf der Netzplatte verändert zu werden braucht. Dies ist natürlich bei der Auszählung kolonienreicher Kulturen wichtig.

Die Abimpfung von einzelnen Kolonien, die bei dicht gewachsenen Kolonien sonst unter dem Mikroskop erfolgen muß, ist mit Hilfe dieses Apparates ohne weiteres durchführbar. Dies hat einen weiteren Vorteil gegenüber den gebräuchlichen Verfahren, wenn jede einzelne abgeimpfte Kolonie sofort auf die darin befindlichen Bakterien untersucht werden muß: früher mußte man dafür entweder 2 Mikroskope haben, oder die Kultur jedesmal aus dem Mikroskop herausnehmen; jetzt bleibt die Kultur auf dem Zählapparat stehen und kann, auch wenn nur ein Mikroskop verfügbar ist, sofort untersucht werden.

Der Apparat ist auch für die Auszählung von Bakteriophagenlöchern gut verwendbar.

Inhalt.

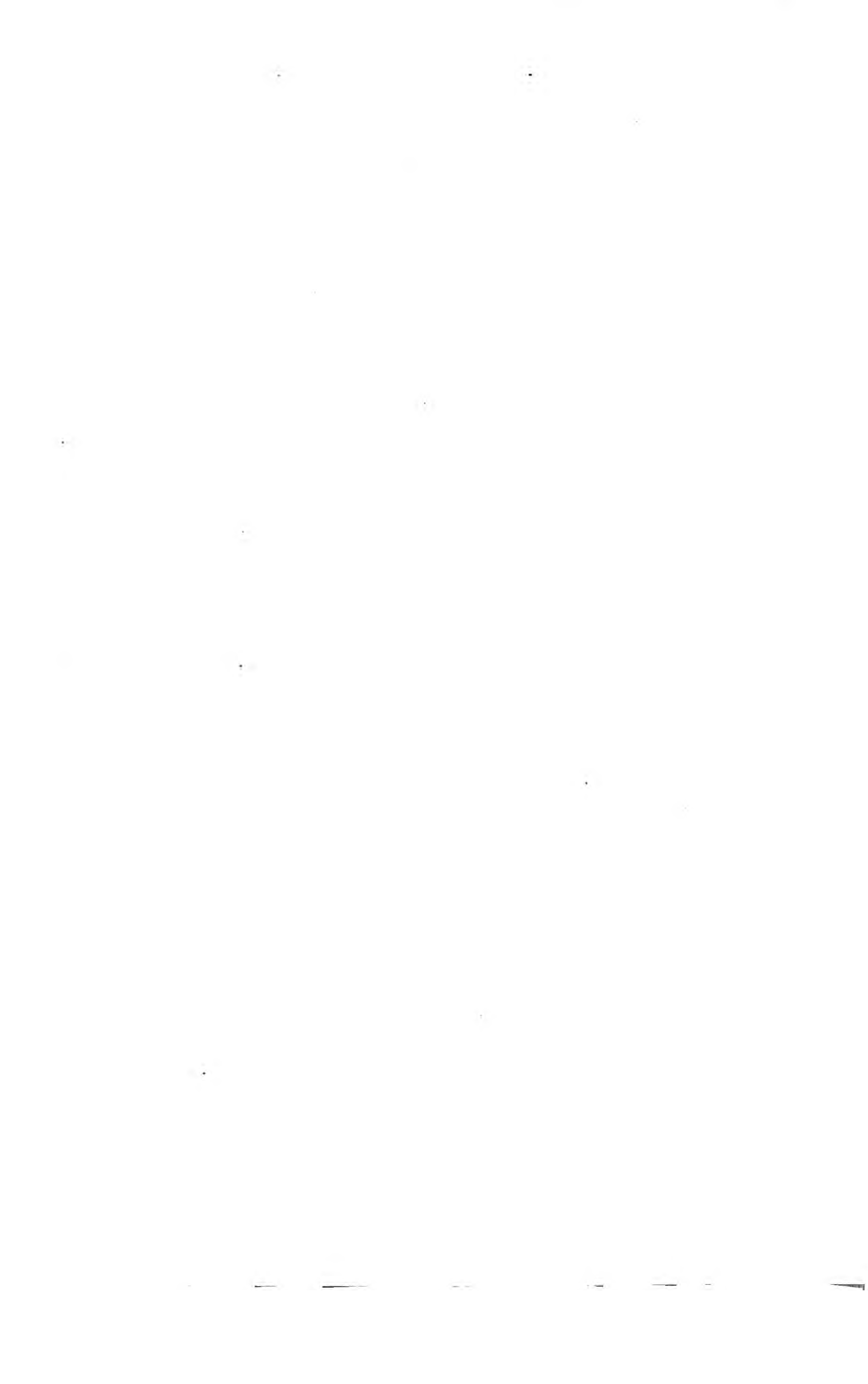
Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena — 5379.

Inhaltsverzeichnis.

I. Verzeichnis der in Band 96 enthaltenen Arbeiten.

II. Sachverzeichnis.

III. Verzeichnis der Abbildungen.



Centralblatt
für
Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten

Erste Abteilung: Medizinisch-hygienische Bakteriologie und tierische Parasitenkunde

Originale

In Verbindung mit
Prof. Dr. R. Abel, Geh. Obermed.-Rat, Jena
Prof. Dr. M. Braun, Geh. Reg.-Rat, Königsberg i. Pr.
Prof. Dr. R. Pfeiffer, Geh. Med.-Rat, Breslau
herausgegeben von
Geh. Reg.-Rat Prof. Dr. O. Uhlworm, Bamberg, Kunigundendamm 61 II
Präsident Dr. A. Weber, Dresden-N. 6, Wilhelmplatz 4 II
und
Prof. Dr. E. Gildemeister, Ob.-Reg.-Rat, Berlin-Lichterfelde W, Victoriastr. 7

Verlag von Gustav Fischer in Jena

96. Band | Jena, 25. November 1925 | Heft 7/8

— Jeder Band umfaßt 8 Hefte, die in zwangloser Folge erscheinen. —

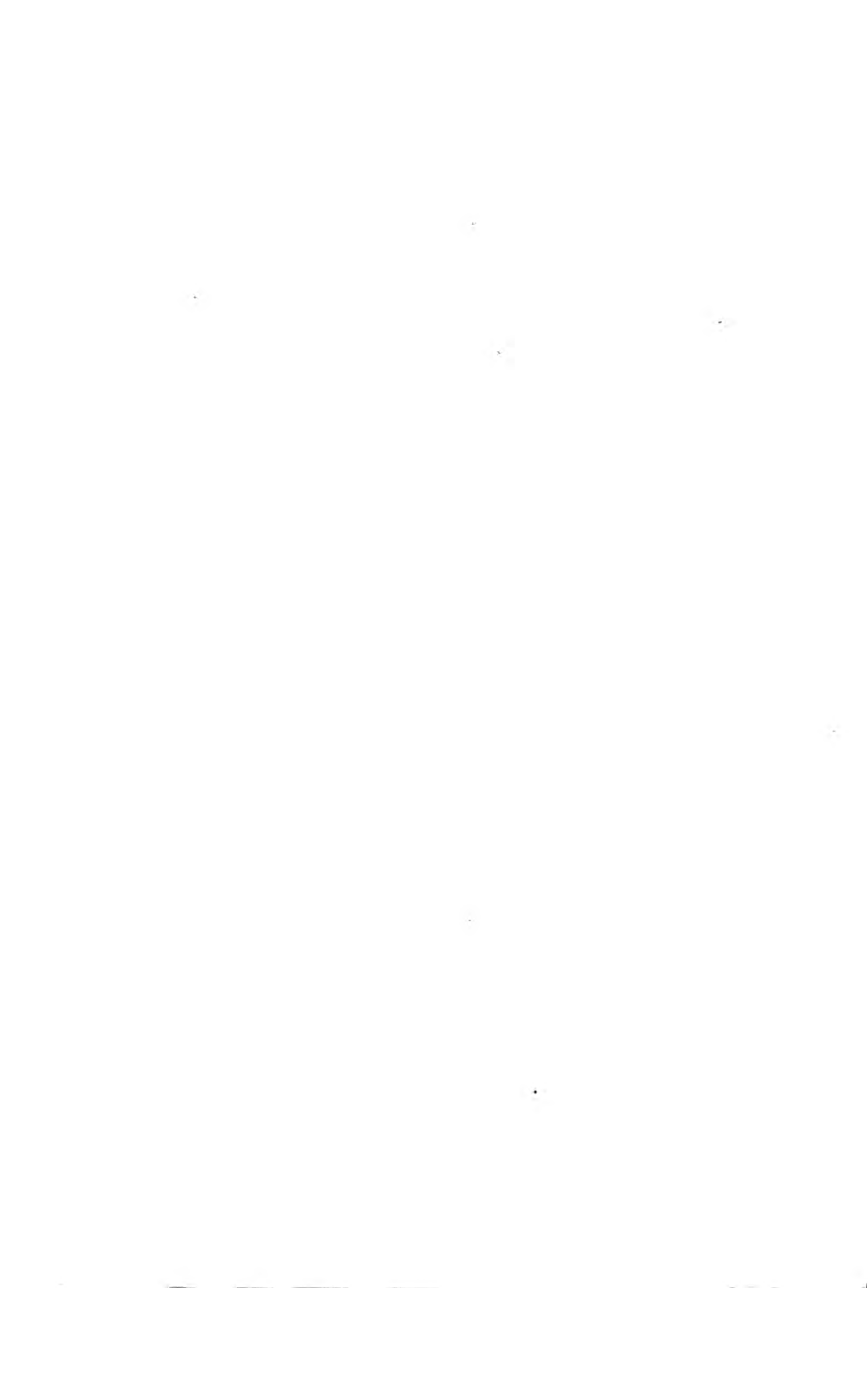
Verlag von Gustav Fischer in Jena

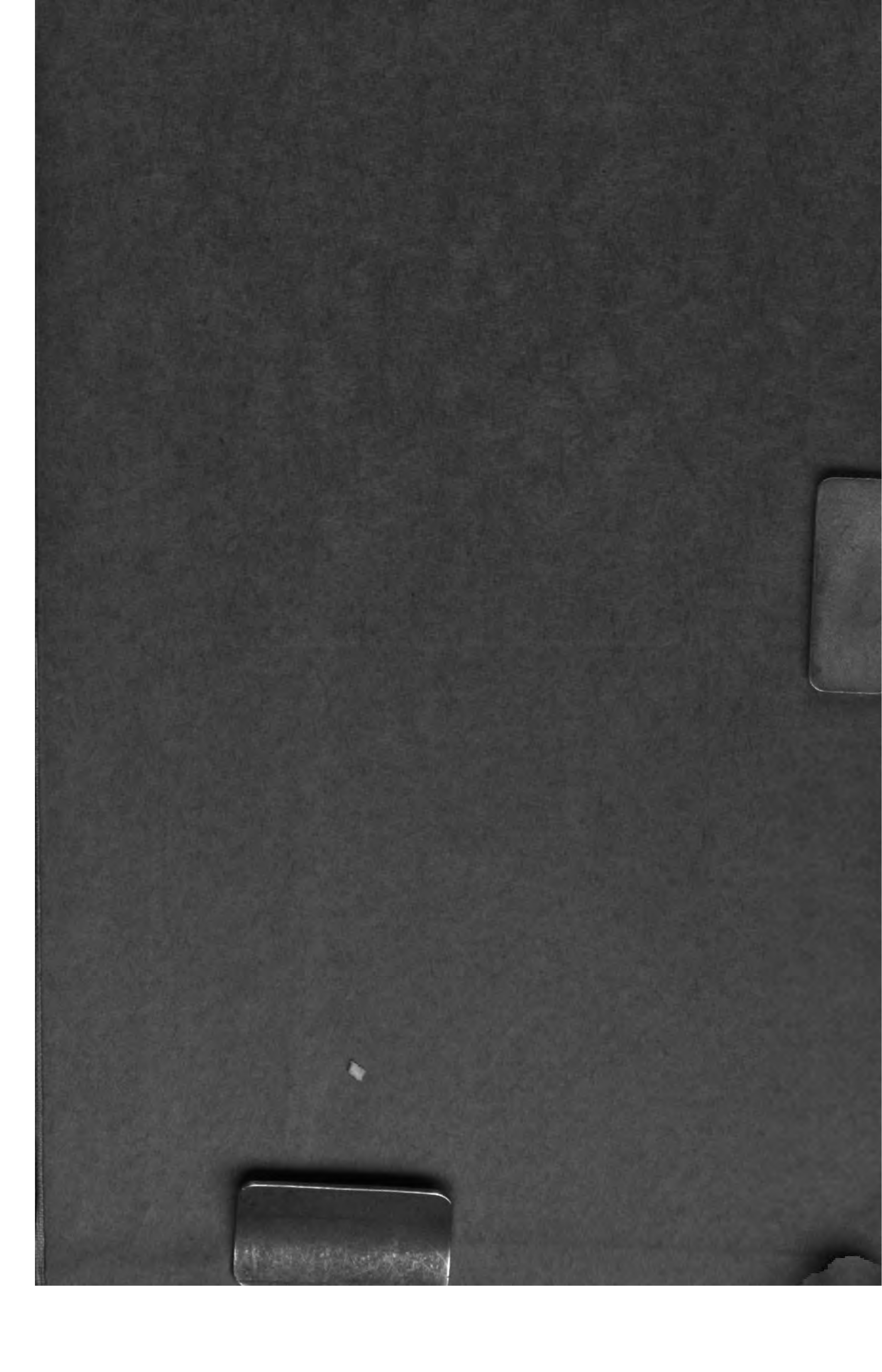
Manuskript und Korrektur. Den jüngeren Kollegen gewidmet von **W. Michaelsen**, Hamburg. 32 S. 8° 1925 Gmk 1.20

Anatomischer Bericht. Bd. 3, Heft 9/12: Das Büchlein soll jüngere Autoren auf die vielfachen Möglichkeiten von Ersparnissen bei der Veröffentlichung von Arbeiten hinweisen. Es gibt sozusagen eine Publikationstechnik. In dem ersten Abschnitt werden Ratschläge für die Abfassung und Handschrift, Regeln für die Druckfertigkeit und Druckreiferklärung des Manuskripts gegeben. Ferner werden die bei wissenschaftlichen Arbeiten gebräuchlichen Schriftarten aufgeführt mit einem Schema einer Anleitung für den Setzer. Die Formel für die Umfangsberechnung eines Manuskripts wird angegeben. Der folgende Abschnitt zeigt, wie Literaturangaben zu machen sind. Zwei weitere Kapitel besprechen kurz die Technik der Herstellung von Abbildungen im Text und auf Tafeln und die hieraus für den Autor sich ergebenden Lehren. Der letzte Teil bringt die allgemein gebräuchlichen Zeichen der Korrekturvermerke mit Beispielen.

Diesem Heft ist ein Prospekt beigefügt von **F. u. M. Lautenschläger, G. m. b. H., Berlin N. 39**, betr. **„Vorzugsangebot für Laboratoriumsgegenstände“.**

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena






UNIVERSITY OF ILLINOIS-URBANA
589.05CE C001
ZENTRALBLATT FUR BAKTERIOLOGIE, PARASITE
96 1925
3 0112 009814986